Université Fédérale
Toulouse Midi-Pyrénées

THÈSE

En vue de l'obtention du
DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par l'Université Toulouse 3 - Paul Sabatier

Présentée et soutenue par

Olivia PEYTRAL-RIEU

Le 7 décembre 2022

Développement d'un microsystème d'analyse de micro-tissus par spectroscopie diélectrique hyperfréquence pour l'évaluation en temps réel d'effets biologiques d'agents chimiques

---

Ecole doctorale : **GEETS - Génie Electrique Electronique,Télécommunications et Santé : du système au nanosystème**

Spécialité : **Electromagnétisme et Systèmes Haute Fréquence**

Unité de recherche :
LAAS - Laboratoire d'Analyse et d'Architecture des Systèmes

Thèse dirigée par
Katia GRENIER et David DUBUC

Jury

M. Arnaud VENA, Rapporteur
M. Pierre-Yves JOUBERT, Rapporteur
Mme Katia GRENIER, Directrice de thèse
M. David DUBUC, Directeur de thèse
Mme Nathalie MALBERT, Présidente

A maman,

Pour cette thèse que tu auras laissé inachevée.

Table des matières générale

REMERCIEMENTS..... 9

RESUME.....13

ABSTRACT.....14

INTRODUCTION GENERALE.....15

ACRONYMES UTILISES DANS LE MANUSCRIT 19

CHAPITRE 1 : DESCRIPTION ET CARACTERISATION DES MICRO-TISSUS COMME MODELE BIOLOGIQUE DU CANCER.....23

1 Introduction.....25
2 Les différents modèles biologiques et leurs applications.....26
2.1 Cultures cellulaires en 2D.....26
2.1.1 Définition.....26
2.1.2 Applications.....26
2.2 Suspensions cellulaires.....27
2.3 Modèles 3D.....27
2.3.1 Biopsies.....27
2.3.2 Biosystèmes sur puces.....28
2.3.3 Sphéroïdes ou Micro-tissus.....29
3 Caractéristiques clés des systèmes de cultures 3D.....31
3.1 Structure globale et formation.....31
3.2 Gradients présents dans les sphéroïdes.....31
3.3 Cinétique de croissance des tumeurs.....32
4 Elaboration des sphéroïdes tumoraux.....33
4.1 Culture sans architectures préalables.....33
4.2 Culture sur des structure en hydrogels.....33
4.3 Culture grâce à des systèmes microfluidiques.....35
4.4 Conclusions.....35
5 Principales techniques de caractérisation des sphéroïdes tumoraux.....36
5.1 Prédiction de cinétique de croissance des sphéroïdes.....36
5.2 Techniques de caractérisations optiques.....36
5.2.1 Optique par fluorescence.....36
5.2.2 MEB.....37
5.3 Autres Types d'analyses des sphéroïdes.....38
5.3.1 Cytométrie en flux.....38
5.3.2 Présence et expression de gènes.....38
5.3.3 Mesure de gradient d'oxygène par résonance paramagnétique électronique.....39
5.3.4 Caractérisation mécanique des sphéroïdes : mesure par déformation.....39
6 Techniques de caractérisations électriques des sphéroïdes.....41
6.1 L'interaction des champs électromagnétiques avec le vivant.....41
6.2 En très basse fréquence : l'ampérométrie.....43
6.3 Spectroscopie Diélectrique.....43

6.3.1 Gamme des MHz – Mesure de l'impédance 43
6.3.2 Gamme des GHz – Mesure de paramètres S 46
7 Conclusions – Positionnement des travaux de thèse 49

CHAPITRE 2 : PREMIER MICRO-DISPOSITIF DE SPECTROSCOPIE DIELECTRIQUE RF POUR L'ANALYSE DE SPHEROÏDES....53
1 Introduction....54
2 Le dispositif initialement étudié....55
2.1 Architecture 55
2.2 Micro-fabrication du dispositif....57
3 Développement de la modélisation électrique 59
4 Validation expérimentale....62
4.1 Protocole Expérimental....62
4.1.1 Mesures HyperFréquence 62
4.1.2 Fabrication des sphéroïdes....63
4.2 Résultats Expérimentaux 64
4.3 Limitations du dispositif....66
4.3.1 Le positionnement de l'objet étudié dans le dispositif....66
4.3.2 L'évaporation & la dérive....69
5 Conclusions et perspectives....71

CHAPITRE 3 : MICRO-DISPOSITIF DE SPECTROSCOPIE DIELECTRIQUE RF POUR L'ANALYSE DES SPHEROÏDES : ARCHITECTURE FLUIDIQUE AVANCEE 73
1 Introduction....75
2 Etat de l'art des structures de piège fluidique 76
2.1 Avec contact....76
2.1.1 Piège vertical....76
2.1.2 Pièges latéraux....78
2.2 Sans contact....79
2.2.1 Hydrodynamique....79
2.2.2 Méthodes électriques....81
2.2.3 Pièges magnétiques 82
2.2.4 Pièges acoustiques....82
2.2.5 Pièges optiques....83
2.3 Conclusions de l'état de l'art....86
3 Cas des capteurs RF à l'échelle de la cellule unique....87
4 Partie A : Optimisation fluidique du capteur 91
4.1 Choix de la configuration du piège fluidique pour sphéroïde, développement et première preuve de concept....91
4.1.1 Choix de la solution de piégeage de sphéroïdes 91
4.1.2 Preuve de concept par la fabrication de piège en technologie PDMS 93
4.2 Micro-fabrication du dispositif fluidique dit fermé....96
4.2.1 Description du dispositif RF fluidique avec piège mécanique....96
4.2.2 Processus de fabrication....97
4.2.3 Optimisations technologiques....99
4.3 Comparaison du dispositif ouvert/fermé....104
5 Partie B : Optimisation de la sensibilité du micro-dispositif RF....107
5.1 Influence de la largeur du gap capacitif sur la mesure hyperfréquence....107
5.1.1 Choix de l'objet modèle et du milieu hôte pour cette étude....107
5.1.2 Simulations électromagnétiques....107
5.1.3 Vérification Expérimentale....110

5.2 Validation sur un cas d'étude 111
6 Conclusions 114

CHAPITRE 4 : DEMONSTRATION DES CAPACITES DU MICRO-DISPOSITIF RF EN CANCEROLOGIE 117
1 Introduction 118
2 Utilisation de la technologie LUCS pour la détermination des concentrations à utiliser 120
2.1 Description de la méthode LUCS développée par l'entreprise AOP 120
2.2 Optimisation de la méthode LUCS pour une utilisation sur sphéroïdes 122
2.3 Détermination de doses réponses de différents agents chimiques 124
3 Mesure d'état biologique statique 127
3.1 Protocole 127
3.2 Résultats & Discussions 127
4 Suivi en temps réel de réponses biologiques 131
4.1 Protocole 131
4.2 Résultats & Discussions 133
5 Conclusions 137

CONCLUSIONS 139

PERSPECTIVES 141

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 143

PRODUCTIONS SCIENTIFIQUES 161

Revues internationales 161

Revues internationales soumises 161

Congrès Internationaux 161

Congrès National et Régional 162

ARXIV 162

Distinctions 162

Remerciements

Remerciements

Merci d'abord à Katia Grenier et David Dubuc de m'avoir accueilli dans leur équipe de recherche : sans eux je n'en serais pas là à écrire les remerciements de mon manuscrit de thèse. Merci d'avoir cru en moi, d'avoir accepté mon franc parlé, et de m'avoir accompagnée pendant ces trois années intenses. Malgré des emplois du temps chargés, vous avez réussi à me former, à m'aiguiller dans mes travaux, être présents dans les moments de doutes et écouter ce que j'avais à proposer pour une véritable co-construction de cette thèse. Je me suis rarement sentie autant écoutée et valorisée professionnellement que depuis que je travaille avec vous. Je vous porte un profond respect et une profonde reconnaissance.

Merci aux membres du jury d'avoir accepté d'évaluer mes travaux de thèse, d'avoir posé de nombreuses questions intéressantes qui permettront, notamment, d'orienter la suite de ces travaux.

Merci à l'entreprise AOP pour m'avoir expliqué et appris à utiliser leurs techniques et pour avoir été mes collègues d'open space pendant la plus grosse partie de ma thèse. L'ambiance à table était toujours assurée en mangeant avec Camille, (et de temps en temps Mylène). Merci pour vos conseils et aide expérimentale tout au long de ma thèse, notamment en biologie !

Etienne et Emmanuelle, de l'équipe ELiA : merci de m'avoir acceptée pour mon stage de master 2, sans qui je n'aurais pu rentrer au LAAS, ni avoir ce sujet de thèse. Découvrir une technique aussi pointue que l'AFM m'a beaucoup appris à l'époque notamment sur la précision et le besoin de statistiques suffisantes permettant de tirer des conclusions.

Merci aux membres de l'équipe I2C sans qui la plateforme caractérisation biochimie et de culture cellulaire ne pourrait fonctionner. Tout particulièrement, merci à Charline, Sandrine, Alexandre, Lucas, Julien et Julie pour vos disponibilités, vos formations et conseils précieux.

Merci aux membres de l'équipe TEAM de travailler pour que la salle blanche permette de sortir des dispositifs au maximum fonctionnels. Je remercie tout particulièrement Véro, Laurent, Adrian, Benjamin, David, Ludo, Aurélie, Boubou et Hugues d'avoir été disponible pour m'aider à comprendre d'où venait mes problèmes, à tenter de trouver des solutions, d'accepter mes remarques et mes propositions pour faire avancer les choses.

Merci au service IDEA sans qui je n'aurais pas pu choisir un ordinateur digne de ce nom pour écrire ces quelques lignes, avoir accès aux logiciels, etc. Merci tout particulièrement à Marido pour ta réactivité, notamment pour tout ce qui touchait les demandes des doctorants, mais aussi à EcoLAAS, le potager, le conseil de labo, etc.

Un grand merci à tous les permanents qui m'ont accueillie et fait me sentir comme leur collègue au sein du laboratoire : Laurent, Bastien, Christophe et Christophe (de l'équipe ELiA), Pierre Joseph, Morgan (de l'équipe Mile), Anne, Antoine (de l'équipe M3), Fuccio, Jérôme,

Pierre Temple-Boyer (de l'équipe MICA), Mohammed (de l'équipe TSF), Pierre Lopez (de l'équipe ROC), Daniela (de l'équipe MINC), Liviu (de l'équipe MEMS) et Marie-Hélène sans qui l'organisation d'évènements festifs n'auraient pas été aussi facile.

Merci Margot de nous avoir refilé ce bébé qu'est le Conseil des Doctorants à Camille et à moi, il fallait bien deux personnes pour remplacer ce que tu faisais. C'est clairement chronophage parce qu'il y a toujours quelque chose à faire mais en même temps c'est très gratifiant d'avoir des retours positifs sur les actions que l'on arrive à mener.

Je souhaite remercier ensuite toutes les personnes de mon équipe, sans qui l'ambiance au jour le jour n'aurait pas été la même. Ali, dit Mosca, mon jumeau de thèse, merci pour ta patience dans toutes nos discussions au tableau. Benjamin parce que tu fais aussi partis des anciens de l'équipe et tes projets toujours plus fous ! Yegor désolée de ne t'avoir appris que des mots qu'il ne faut pas dire en français… Anne, tu vas y arriver et ce sera grâce à toi et tout ce qui fait que tu es toi, comme dirait Rabelais « je considère que le temps murît toutes choses : par temps toutes choses viennent en évidence ». Yuwei, you just came in this team, but I feel it you will be a great adventure at the end, thank you for all the little presents you give me!

Camille, ma pote, merci d'avoir été là tout au long de l'aventure, je vais essayer d'être là jusqu'à la fin de ta thèse, à priori il ne me restera que quelques mois à tenir après l'ATER pour que ça marche. Tu es l'incarnation pour moi d'une citation que j'aime beaucoup : « tout seul on va plus vite, ensemble on va plus loin ». Je n'aurais pas pu faire tout ce qu'on a fait pour les doctorants sans toi. Sans la queen du LAAS, ma vie aurait été beaucoup plus monotone au laboratoire !

Merci aux autres collègues doctorants (ou plus doctorants mais pas encore permanents) en vrac pour les très bons moments à midi, pendant les évènements au laboratoire et en dehors. L'ambiance de travail autour de la thèse est tellement importante… Elise et Eugénie tenez bon on va arriver à faire bouger les choses. Sans vous il y a énormément de choses que l'on n'aurait jamais été capable de faire qu'avec Camille pour les animations au laboratoire. Sabah, merci de ta bonne humeur communicative, tu m'impressionneras toujours à être capable de ne pas toujours manger le midi et de tenir des journées de X heures (ouais j'ai mis X parce que tu en fais trop pour que je les compte !) … Sév' parce que même si tu n'es pas du LAAS, on dirait… Titou, stagiaire devenu grand mieux payé que moi. Tiphaine pour la création et le maintien des tomates dans les jardins du laboratoire. Mais aussi Inès, Matthieu, Ophélie, Victor Fabre, Victor Fournie, Yanis, Claire, Aziliz, Vignesh, Pierre, Céline, Guillaume, Sabrina, Lucas.

Les membres du club rugby qui au fil des années, certains ont pris des coups d'épaules et on m'a aussi déchiré un short, un pantalon et un ou deux teeshirts parce que le flag est à hauteur des hanches… Comme dirait certains « j'ai donné, j'ai donné, bon j'ai pris un peu aussi… » Tout particulièrement, Baptiste, aussi appelé chef, toujours patient malgré le niveau plus que moyen de ces élèves au rugby. Jérôme, fidèle au poste. Denis a arrêté mais je me souviens toujours des entrainements et ses mails sont toujours croustillants. Sans oublier P'tit Paul, Mohammad, Jules et les occasionnels ou anciens : Lyne, Gaël, Sylvain, Lucas.

Je voudrais ensuite remercier mes amis de longue date parce que sans les soirées tranquilles, les concerts et les festivals pour certains je n'aurais pas tenu trois ans… Guigui le mystérieux, JLo le belge (plus pour très longtemps il paraît), Flo propriétaire de la panthère noire des Calanques, Flo le véto #burgers, Jiwai et Lucille pour la maison dans la campagne avec plein d'animaux. Et puis les amis plus récents mais tout aussi important : Delphine la masseuse, Alex, Ben du biéro, Mathias, Léa, Juliette.

Merci Laurent de ma troupe TurbaMusica, j'ai beaucoup appris grâce à toi, tu m'as apporté beaucoup d'estime de moi quand j'en avais besoin.

Merci Valentin, dragon, une relation qui a évolué partant de simplement des pauses thé dehors lors des besoins de débriefer à aujourd'hui où on partage le même quotidien. Ce qui n'a pas changé c'est nos discussions à bâtons rompus sur tous les sujets, nos débats interminables quand nous ne sommes pas d'accord et les moments où nous rageons sur tout ce qui ne changera pas de ci-tôt. Merci de faire partie de ma vie, et pour être plus terre à terre, merci de ton aide (pour améliorer mon anglais écrit), de m'écouter, de me comprendre et de m'épauler.

Enfin, merci à ma famille : Vincent, Maman et Rara. Vincent, heureusement que tu es là pour t'occuper de maman, je ne lui ferais pas confiance si elle était toute seule ! Clara, parce que *''nulle amie ne vaut une sœur''* même si la vie fait que tu n'es pas toujours d'accord avec moi et inversement, tu seras toujours là et je serais toujours là pour toi. Tu vas arriver à tout ce que tu souhaites je n'en doute pas une seconde. Maman, tu as toujours cru en moi, toujours répétée que j'étais la meilleure et même si j'ai toujours pensé que tu n'avais pas un avis objectif, ça m'a aidé à avancer. Tu ne l'aurais pas fait que je ne sais pas où je serais. Cela dit, je t'avais dit que j'irais au bout, pour moi et pour toi. Pour me prouver que j'étais capable de le faire et que si les études servent à quelque chose : une revanche sur tellement d'aspect. Je suis docteure et je travaille dans la recherche pour notamment soigner le cancer, comme je l'avais décidé au lycée. J'ai réussi, grâce à toi, grâce à Clara, non sans difficulté, non sans doute, non sans moment où je voulais tout lâcher et tout abandonner. Mais, au fond de moi, je ne pouvais pas abandonner, je rêvais d'être enseignant-chercheur, j'y suis presque et c'est grâce à mon entourage aussi alors merci pour tout.

"Les aptitudes sont ce que vous pouvez faire. La motivation détermine ce que vous faites. Votre attitude détermine votre degré de réussite."

De Lou Holtz

Résumé, Abstract & Introduction

Résumé

La spectroscopie diélectrique micro-onde représente une technique analytique prometteuse pour de nombreux champs applicatifs, biologie cellulaire notamment. Elle permet en effet d'étudier de façon non invasive et non destructive des cellules dans leur milieu de culture grâce à leurs propriétés diélectriques. Ceci peut être réalisé à des échelles variées, que ce soit à l'échelle de l'organe ou du tissu, de suspensions de cellules jusqu'à l'analyse de cellules individuelles. En outre, il existe une échelle intermédiaire non encore abordée avec une telle technique d'analyse, celle des micro-tissus ou encore appelés sphéroïdes, modèle biologique in vitro fortement prisé car se rapprochant des problématiques rencontrées in vivo. Il s'agit d'amas de cellules agrégées entre elles, qui présentent différents gradients, tant en composition qu'environnemental. Les cellules sont en contact les unes aux autres et forment une sphère, d'où le terme de modèle 3D ou encore de sphéroïde. Les travaux de thèse visent donc à étendre les capacités d'analyse cellulaire par spectroscopie diélectrique micro-onde à cette nouvelle échelle, celle des micro-tissus. Les travaux réalisés font suite à un premier démonstrateur développé antérieurement dans l'équipe de recherche MH2F du LAAS. Ce premier micro-capteur RadioFréquence (RF) adapté à la mesure micro-onde de sphéroïdes de 300 µm de diamètre maintenu dans leur milieu de culture par un système fluidique ouvert de type réservoir avait été conçu, fabriqué et commencé à être évalué au préalable. Outre une caractérisation plus poussée de ce composant à l'aide de multiples modèles, billes de polystyrène et sphéroïdes, pour en définir les capacités et limitations de mesure, une modélisation électrique permettant d'obtenir les paramètres diélectriques de l'objet étudié a ainsi été développée. Ainsi, après avoir présenté les sphéroïdes comme modèle biologique et les différentes techniques de caractérisation existantes de ce type de modèle dans un premier chapitre, le second chapitre est dédié à l'introduction de ce premier démonstrateur et de ses capacités d'analyse. Différentes solutions ont alors été envisagées afin de pallier ces limitations, dont le fait de rendre la configuration fluidique fermée en association à un système de blocage du sphéroïde à étudier pour un positionnement précis et donc augmenter la sensibilité de détection. Le troisième chapitre de ce manuscrit présente les développements correspondants, à savoir la conception totalement revue du composant et l'optimisation de son procédé de fabrication. Une étude de sensibilité de détection suivant le dimensionnement du capteur a également été menée numériquement et vérifiée expérimentalement. La caractérisation de sphéroïdes vivants, fixés et aussi soumis à un autre agent chimique que le paraformaldéhyde (utilisé pour la fixation), la chloroquine, a permis d'évaluer le potentiel du dispositif en vue d'une application de type criblage de médicaments. Pour réaliser cette étude, une collaboration avec l'entreprise Anti-Oxydant Power a été menée. La détection par technique RF de l'impact du changement environnemental cellulaire sur sphéroïdes pour différentes concentrations d'agent chimique appliqué donne ainsi une preuve de concept importante à l'échelle de modèle 3D de l'adéquation de cette technique de mesure pour observer des transformations cellulaires et même tissulaires, en complémentarité aux outils optiques classiques, et ce de façon non invasive et non destructive et sans besoin de marquage préalable. Ces résultats ouvrent donc de nouvelles perspectives d'analyse pour évaluer la réponse biologique de tels modèles tridimensionnels soumis à des agents chimiques.

Abstract

Microwave dielectric spectroscopy is a promising analytical technique for many fields of application, especially cell biology. It allows to study cells in their culture medium in a non-invasive and non-destructive way thanks to their dielectric properties. This can be done at various scales, from organ or tissue, from cell suspensions to single cell analysis. In addition, there is an intermediate scale not yet approached with such an analysis technique, that of micro-tissues or spheroids, a highly prized in vitro biological model because it is close to the problems encountered in vivo. These are clusters of cells aggregated together, which present different gradients, both in composition and environment. The cells are in contact with each other and form a sphere, hence the term 3D model or spheroid. The aim of this thesis is to extend the capabilities of cellular analysis by dielectric microwave spectroscopy to this new scale, that of micro-tissues.

This work follows a first demonstrator previously developed in the MH2F research team of LAAS. This first Radiofrequency (RF) microsensor adapted to the microwave measurement of spheroids of 300 µm diameter maintained in their culture medium by an open fluidic system of the reservoir type had been designed, manufactured and started to be evaluated beforehand. In addition to further characterization of this component using multiple models, polystyrene beads and spheroids, to define its measurement capabilities and limitations, an electrical model to obtain the dielectric parameters of the object under study was developed. Thus, after having introduced the spheroids as a biological model and the various existing characterization techniques of this type of model in a first chapter, the second chapter is dedicated to the introduction of this first demonstrator and its analysis capacities. Different solutions were then considered in order to overcome these limitations, including making the fluidic configuration closed in association with a blocking system of the spheroid to be studied for a precise positioning and thus increase the detection sensitivity. The third chapter of this manuscript presents the corresponding developments, namely the completely redesigned component and the optimization of its manufacturing process. A study of the detection sensitivity according to the dimensioning of the sensor has also been carried out numerically and verified experimentally. The characterization of living spheroids, fixed and also subjected to another chemical agent than paraformaldehyde (used for fixation), chloroquine, allowed to evaluate the potential of the device for a drug screening application. To carry out this study, a collaboration with the company Anti-Oxidant Power was conducted. The detection by RF technique of the impact of the cellular environmental change on spheroids for different concentrations of applied chemical agent thus gives an important proof of concept at the scale of 3D model of the adequacy of this measurement technique to observe cellular and even tissue transformations, in complementarity with the traditional optical tools, and this in a non-invasive and non-destructive way and without need for preliminary marking. These results open new analytical perspectives to evaluate the biological response of such 3D models submitted to chemical agents.

Introduction générale

D'après l'Organisation Mondiale de la Santé le cancer est la seconde cause de mortalité dans le monde. Le cancer est une maladie provoquée par une cellule initialement normale mais dont le programme biologique se dérègle et la transforme. Celle-ci se multiplie et en produit d'autres, dites « anormales », qui prolifèrent de façon anarchique et excessive. Pourtant, dans le corps humain énormément de cellules se renouvellent en permanence et de nombreuses « erreurs » dans la prolifération peuvent apparaitre. La plupart de celles-ci sont reconnues et détruites par notre système immunitaire avant qu'elles ne deviennent dangereuses. Mais lorsque ce dernier ne décèle pas l'erreur, elles peuvent se transformer en tumeur. Ce qui la caractérise, c'est une demande en nutriments particulièrement importante puisque les cellules, qui la composent, se multiplient de façon excessive. Lorsque les tumeurs continuent à se développer sans contraintes, elle grossit et modifie son environnement de façon à avoir toujours plus de nutriments. Lorsque rien n'est fait, une tumeur peut atteindre les vaisseaux sanguins les plus proches de façon à récupérer les nutriments directement à leurs sources : ce phénomène est appelé l'angiogenèse. Et puis quand l'espace est trop contraint, des cellules se différencient pour devenir invasives et peuvent migrer, grâce aux vaisseaux sanguins, jusqu'à un autre organe à l'autre bout du corps : c'est la formation de métastases. Généralement à partir de l'angiogenèse le pronostic vital est engagé et très peu de traitements pourront venir à bout du cancer. Ce qui fait du diagnostic un enjeu fondamental. Mais lorsqu'il est établi la tâche n'en est pas plus facile. En effet, les cellules prolifèrent partout dans le corps : donc un cancer peut apparaitre dans n'importe quel tissu. La conséquence étant qu'il n'y a pas un seul traitement pour le cancer mais un traitement par cancer.

L'environnement en trois dimensions de la tumeur est particulièrement important dans la façon dont elle va évoluer : des contraintes mécaniques qu'elle va subir pendant sa croissance, à la façon dont les cellules vont devenir plus ou moins invasives (Marhuenda et al. 2021; Veelken et al. 2017). Sa structure est, elle-même, une structure en trois dimensions très complexe liée au caractère anormal des cellules et de leur façon de proliférer. Par conséquent, les études réalisées sur un cancer donné sont nécessairement simplifiées par rapport à une situation réelle parce qu'il n'est pas encore possible de reproduire des organes complets en laboratoire. De nombreux modèles différents existent en fonction du degré de réalisme recherché dans une expérience donnée. Les plus réalistes sont certainement ceux venant directement d'échantillons de patients mais leur conservation est très compliquée. Les moins réalistes restent les cultures cellulaires en deux dimensions dans des flasques plates. Entre les deux, il y a un modèle qui intéresse énormément de scientifiques puisqu'il permet d'avoir une structure en trois dimensions tout en restant facile à conserver en laboratoire : le sphéroïde. Son élaboration consiste à cultiver des cellules cancéreuses adhérentes sans structure sur laquelle elles peuvent adhérer afin qu'elles forment une sphère d'elles-mêmes. Au sein de cette grande catégorie que sont les sphéroïdes, de nombreuses nuances existent en fonction du temps de culture, du nombre de cellules, du nombre de lignées cellulaires utilisées. Avec

un raccourci certain, il est possible de dire que plus le temps de culture est long (ou plus il y a de lignées cellulaires différentes impliquées – en un mot plus le modèle est compliqué –) plus la structure se rapprochera d'une situation réelle, d'un micro-tissus à proprement parler. Ces genres de structures biologiques sont d'autant plus intéressants qu'ils permettent l'utilisation de cellules de lignées humaines. Les résultats obtenus, notamment lorsque des traitements chimiques sont testés, sont bien plus pertinents que ceux fait à partir de tests sur animaux.

La caractérisation de ces modèles du cancer ou des effets potentiels d'un médicament donné sur ceux-ci se font, historiquement, principalement par des méthodes biochimiques. La plus répandue reste les traitements avec des anticorps fluorescents spécifiques d'une protéine, d'un ADN, d'un ARN ; d'une molécule d'intérêt, afin de pouvoir observer sa présence (ou son absence) par microscopie. Ces informations peuvent ensuite être corroborées par des techniques telles que les Western Blot ou les PCR qui permettent de quantifier cette présence. Le principal inconvénient de ces procédés réside dans la nécessité de pré-traitement important : ce sont des méthodes invasives et destructives des échantillons. Il y a un réel besoin d'approches différentes qui seraient complémentaires : non invasives, non destructives et sans traitement préalable.

L'analyse par spectroscopie diélectrique des tissus biologiques, répond parfaitement à ces critères. En effet, en contrôlant la puissance des ondes électromagnétiques qui sont utilisées, il est possible de sonder les caractéristiques diélectriques des tissus biologiques de façon non invasive, non destructive et sans traitement préalable. D'autant plus que ce type de méthode est combinable avec les récentes avancées en micro-fabrication permettant de miniaturiser les dispositifs. De même, ce type de technique est compatible avec les dernières avancées de la micro-fluidique permettant l'ouverture d'un nouveau pant d'études en temps réel dans des conditions quasi normales de culture.

Ces travaux de thèses ont pour objectif d'étudier un modèle du cancer en trois dimensions : le sphéroïde. L'objectif principal est de montrer l'intérêt que peut présenter la technique d'analyse diélectrique dans le domaine fréquentiel des gigahertz, pour extraire des informations sur les sphéroïdes, sans utiliser de marquage, et en maintenant les cellules dans leur milieu de culture, ce qui par conséquent ouvre les possibilités d'analyses en temps réel.

Cette thèse est multidisciplinaire à la croisée des domaines de la biologie, de l'électronique hyperfréquence, de la micro-fluidique, de la micro-fabrication et effleure même la pharmacologie. Le laboratoire dans lequel cette thèse s'est déroulée est le Laboratoire d'Analyse et d'Architecture des Systèmes (LAAS). Il est fondé sur des champs disciplinaires qui constituent sa marque de fabrique depuis sa création : l'informatique, la robotique, l'automatique et les micro- et nano-systèmes. Au sein de ces disciplines, les thématiques de recherche du LAAS s'articulent autour de 6 départements scientifiques animant l'activité des 26 équipes de recherche, unités de base de la recherche du laboratoire. Le LAAS travaille ainsi sur divers types de systèmes : micro et nano systèmes, systèmes embarqués, systèmes intégrés, systèmes répartis à large échelle, systèmes biologiques, systèmes mobiles, systèmes autonomes et infrastructures critiques, ayant des domaines d'applications tels que : aéronautique, espace, transports, énergie, services, santé, télécommunications, environnement, production et défense.

Ce manuscrit de thèse est organisé en quatre grandes parties :

- Le premier chapitre traite des différents modèles du cancer existants et justifie le choix de l'utilisation de sphéroïde pour la recherche dans le cancer. Il présente ensuite les différentes méthodes de fabrication et de caractérisation de celui-ci.
- Le deuxième chapitre présente le premier dispositif fluidique utilisé. Une modélisation électrique permettant l'analyse des données de spectroscopie diélectrique microonde est proposée. Les protocoles utilisés pour la fabrication des sphéroïdes et des mesures hyperfréquences sont décrits. Enfin, ce dispositif fluidique et ses limites sont caractérisés expérimentalement.
- Le troisième chapitre présente le développement d'un tout nouveau dispositif fluidique qui permet de supprimer les limites présentées dans le chapitre précédent. L'architecture, la preuve de concept et la micro-fabrication optimisée de la structure fluidique optimisée sont présentés. Ensuite une étude d'amélioration de la structure hyperfréquences est proposée par simulations électromagnétiques et de façon expérimentale. Enfin, une validation du dispositif est réalisée sur des échantillons biologiques dans deux conditions « extrêmes ».
- Le quatrième et dernier chapitre présente l'application du dispositif dans une étude biologique en trois phases. Tout d'abord, la toxicité sur sphéroïdes des molécules choisies (pour réaliser les traitements chimiques ultérieurs), est déterminée grâce à une technologie, disponible au LAAS-CNRS qui a été préalablement optimisée sur micro-tissus. Ensuite, la discrimination de deux traitements chimiques est faite par mesure spectroscopique d'état statique. Les traitements des sphéroïdes sont alors réalisés préalablement à leur mesure hyperfréquences. Enfin, le développement d'un protocole permettant l'analyse en temps réel des micro-tissus est développé. Les traitements chimiques étant alors réalisés en même temps que leur mesure hyperfréquences grâce au micro-dispositif fluidique développé dans le chapitre précédent.

L'apport potentiel de la méthode de détection par rapport aux techniques établies fera l'objet d'une discussion en fin de manuscrit.

Listes des acronymes

Acronymes utilisés dans le manuscrit

2D = deux dimensions
3D = trois dimensions
ADN = Acide Désoxyribonucléique, acide du noyau des cellules vivantes, constituant essentiel des chromosomes et porteur de caractères génétiques.
ARN = Acide Ribonucléique, acide nucléique essentiel dans le transport du message génétique et la synthèse des protéines.
ACEO = Electroosmose à courant alternatif
AOP = Anti Oxidant Power (entreprise partenaire)
Au = Or
CPW = guide d'onde coplanaire
Ctrl = Contrôle
DEP = Dielectrophorèse
DMEM = Dulbecco's Modified Eagle Medium, milieu utilisé en culture cellulaire
DUT = Device Under Test ou dispositif sous test
ECIS = Détection d'Impédance Electrique Cellule-substrat
EIS = Spectroscopie Electrique d'Impédance
EM = Electromagnétique
FDTS = Perfluorodecyltrichlorosilane
GHz = Gigahertz et toutes les autres unités ; Hz = Hertz ; MHz = Megahertz, THz = Térahertz
HEPES = acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
HF = Hyperfréquence
ICEO = Electroosmose à charge induite
LAAS-CNRS = Laboratoire d'Analyse et d'Architecture des systèmes, unité propre de recherche du centre national de la recherche scientifique
LiPc = Lithium phtalocyanine
LUCS = Light-Up Cell System, technique développée par l'entreprise AOP
MEB = Microscope électronique à balayage
MEC = Matrice extra-cellulaire
ML = Ligne microrubant
ODEP = Dielectrophorèse optique
PBS = Phosphate Buffer Saline, solution saline comportant les mêmes concentrations ioniques qu'un milieu de culture cellulaire classique
PDMS = Polydiméthylsiloxane
PEG = Poly(éthylène glycol)
PGL = Lignes de Goubeau planes
P/S = Pénicilline/Streptomycine, mélange d'antibiotique nécessaire en culture cellulaire
RF = Radiofréquence
SAW = Onde acoustique de surface
SIW = Guides d'ondes intégrés au substrat

SOLT = Calibration Short Open Load et Thru
SVF = Sérum de veau fœtal
Ti = Titane
TO = Thiazole Orange
TSA =Trichostatine A
USW = Ondes stationnaires ultrasoniques
VNA = Analyseur de réseaux vectoriels

Chapitre 1

Chapitre 1 : Description et caractérisation des micro-tissus comme modèle biologique du cancer

Table des matières

1 INTRODUCTION 25

2 LES DIFFERENTS MODELES BIOLOGIQUES ET LEURS APPLICATIONS 26

2.1 Cultures cellulaires en 2D 26
2.1.1 Définition 26
2.1.2 Applications 26

2.2 Suspensions cellulaires 27

2.3 Modèles 3D 27
2.3.1 Biopsies 27
2.3.2 Biosystèmes sur puces 28
2.3.3 Sphéroïdes ou Micro-tissus 29

3 CARACTERISTIQUES CLES DES SYSTEMES DE CULTURES 3D 31

3.1 Structure globale et formation 31

3.2 Gradients présents dans les sphéroïdes 31

3.3 Cinétique de croissance des tumeurs 32

4 ELABORATION DES SPHEROÏDES TUMORAUX 33

4.1 Culture sans architectures préalables 33

4.2 Culture sur des structure en hydrogels 33

4.3 Culture grâce à des systèmes microfluidiques 35

4.4 Conclusions 35

5 PRINCIPALES TECHNIQUES DE CARACTERISATION DES SPHEROÏDES TUMORAUX.....36

5.1 Prédiction de cinétique de croissance des sphéroïdes 36

5.2 Techniques de caractérisations optiques.....36
5.2.1 Optique par fluorescence.....36
5.2.2 MEB 37

5.3 Autres Types d'analyses des sphéroïdes.....38
5.3.1 Cytométrie en flux.....38
5.3.2 Présence et expression de gènes 38
5.3.3 Mesure de gradient d'oxygène par résonance paramagnétique électronique 39
5.3.4 Caractérisation mécanique des sphéroïdes : mesure par déformation.....39

6 TECHNIQUES DE CARACTERISATIONS ELECTRIQUES DES SPHEROÏDES.....41

6.1 L'interaction des champs électromagnétiques avec le vivant 41

6.2 En très basse fréquence : l'ampérométrie.....43

6.3 Spectroscopie Diélectrique 43
6.3.1 Gamme des MHz – Mesure de l'impédance.....43
6.3.2 Gamme des GHz – Mesure de paramètres S.....46

7 CONCLUSIONS – POSITIONNEMENT DES TRAVAUX DE THESE.....49

1 INTRODUCTION

Ce premier chapitre donne les contours du contexte de la thèse à mi-chemin entre la biologie et la physique. Le découpage du chapitre en quatre grands axes est à l'image de nos besoins pour construire ce travail de thèse. Avant d'envisager un nouveau mode de caractérisation biologique, il nous faut comprendre les modèles cellulaires que nous utilisons mais également le fonctionnement des outils qui existent déjà dans les laboratoires de biologie cellulaire pour caractériser les cellules. De même, nous avons besoin de comprendre ce que l'analyse diélectrique est théoriquement capable de discriminer au niveau cellulaire. Enfin, nous ferons une revue de ce que les scientifiques qui travaillent sur ce type de détection ont montré jusqu'à présent pour arriver au positionnement de ce travail de thèse.

Dans un premier temps l'échelle de culture cellulaire dite en deux dimensions est présentée, c'est-à-dire permettant la culture sur des surfaces planes ou en suspension : quand il n'y a que très peu d'interaction d'une cellule à l'autre. Ensuite, il sera décrit comment les ondes électromagnétiques interagissent avec les tissus biologiques. En effet, les deux principales méthodes de caractérisation des cultures cellulaires en 2D dont nous aurons besoin pour comparer ces travaux de thèse à la littérature sont la cytométrie en flux d'impédance et la spectroscopie d'impédance diélectrique qui sont toutes deux basées sur ces théories. Elles seront aussi détaillées dans cette partie.

Dans un second temps, il sera question de la description de l'échelle de culture cellulaire dites en trois dimensions avec ces champs d'applications et le choix du modèle particulier pour cette thèse : le sphéroïde. Le choix de ce modèle sera discuté. Les enjeux correspondant à un tel type de culture seront décrits, ainsi que les caractéristiques de ces systèmes biologiques et leurs intérêts vis-à-vis de la recherche contre le cancer. Une partie en suivant sera consacrée à décrire les différentes méthodes de créations de sphéroïdes en fonction des applications. En effet, le choix de la méthode de fabrication est la plupart du temps dépendante de l'analyse voulue de l'objet biologique.

Dans un troisième temps, les méthodes existantes pour caractériser les sphéroïdes seront présentées en quatre grandes catégories : les modèles mathématiques de prédiction de la croissance, les méthodes de caractérisation optique, les autres méthodes biologiques et les méthodes électriques. Les autres méthodes biologiques comprennent : la cytométrie en flux ; les méthodes biochimiques telles que le Western Blot ou la PCR, mais aussi toutes les méthodes d'analyse de paramètres physiques comme la mesure de gradient d'oxygène par résonance paramagnétique électronique et la déformation mécanique. La partie consacrée aux méthodes de caractérisation électrique des sphéroïdes permettra de détailler les interactions des ondes électromagnétiques avec le vivant en fonction de la fréquence appliquée et ce qu'elles permettent d'obtenir comme informations par le biais de la détermination de leurs propriétés diélectriques.

Enfin, l'état de l'art de ce que les scientifiques font déjà en caractérisation diélectrique des sphéroïdes en fonction de la fréquence (et donc de la méthode expérimentale) sera détaillé pour arriver au positionnement de ce travail de thèse.

2 LES DIFFERENTS MODELES BIOLOGIQUES ET LEURS APPLICATIONS

Dans cette première partie les différentes échelles de modèle biologique du cancer seront décrites rapidement afin d'en évoquer leurs avantages et leurs inconvénients respectifs vis-à-vis de leur similarité avec la réalité biologique *in vivo*. Ces différentes échelles sont toutes représentées dans la Figure 1.

2.1 CULTURES CELLULAIRES EN 2D

2.1.1 Définition

Dans la culture cellulaire en deux dimensions, les cellules grossissent en monocouches sur des surfaces solides plates, généralement en plastique, comme elle est représentée à la Figure 1 A). L'avantage de ce type de culture cellulaire tient en la facilité d'entretien, son coût particulièrement raisonnable et les performances obtenues dans les tests fonctionnels. Malheureusement, les cultures adhérentes ont aussi de nombreux désavantages : la structure naturelle des tumeurs n'est pas reproduite. En effet, les interactions cellule-cellule et cellule-environnement ne sont pas représentatives d'une masse tumorale. Or elles sont responsables de la différentiation, la prolifération, la vitalité, l'expression de gènes et de protéines, la métabolisation des médicaments, etc. Les cellules mises en culture en 2D sont étirées et subissent des réarrangements cytosquelettiques aboutissant à des polarités et des morphologies artificielles, ce qui change considérablement leurs réponses à certains phénomènes comme l'apoptose (Nath et Devi 2016; Kapałczyńska et al. 2016).

2.1.2 Applications

Cette méthode a été utilisée comme un outil d'évaluation de performance biologique de molécules bioactives proposées dans le cadre de traitements thérapeutiques de différentes maladies comme celle du Parkinson, le sida, le diabète ou le cancer. Sa facilité de prise en main, son coût faible, sa bonne reproductibilité et son habilité à permettre la culture de

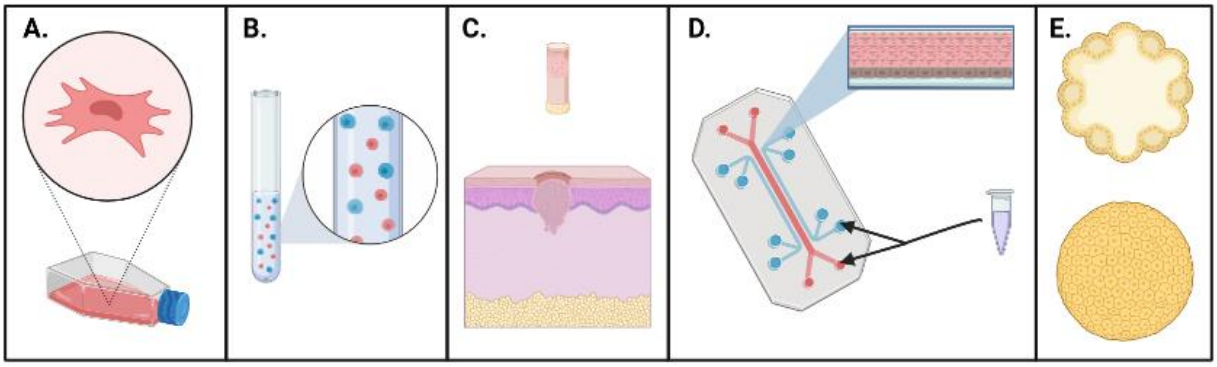


Figure 1 : Représentations schématiques des différents modèles cellulaires du cancer. a) La culture cellulaire en tapis adhérent, dite 2D. b) Représentation schématique de cellules en suspensions. c) Représentation d'une biopsie, d) Représentation d'un organe-sur-puce et e) Schéma de deux types de sphéroïdes en fonction des cellules utilisées. Figure dessinée grâce à l'application Biorender.

multiples types cellulaires en ont fait le modèle de culture le plus utilisé dans les tests précliniques in vitro dans le développement des nouveaux médicaments. De plus, l'utilisation de systèmes de culture cellulaire a permis de réduire l'utilisation d'animaux comme modèle de laboratoire (Costa et al. 2016).

2.2 SUSPENSIONS CELLULAIRES

Un autre modèle biologique correspond aux suspensions cellulaires, à savoir des cellules en milieu liquide, représenté à la Figure 1 B). En effet, certains types cellulaires n'étant pas adhérentes par nature comme la plupart des cellules composant le sang, les cultures des lignées cellulaires correspondantes se fait en suspension. Ce modèle devient alors un modèle incontournable lors de l'étude des différentes leucémies (Huh et Ibrahim 2000). Notamment parce qu'il permet d'analyser de nombreuses cellules en un temps court et ce pour des cellules non adhérentes comme adhérentes remisent en suspension. De plus, avec certaines techniques, comme la cytométrie en flux (qui sera décrite plus tard dans ce manuscrit), les analyses de tels échantillons se font cellules par cellules permettant du haut débit sans perdre les informations liées aux cellules individuelles. L'analyse des cellules uniques a gagné de l'attention dans la dernière décennie puisque l'hétérogénéité des populations cellulaires peut être responsable de certaines pathologies.

2.3 MODELES 3D

2.3.1 Biopsies

Plusieurs façons d'utiliser les biopsies existent, allant de la culture des cellules récoltées en 2D, jusqu'à la culture dans des systèmes micro-fluidiques, la xénogreffe de tumeur sur un autre animal, la fabrication d'organoïdes avec les cellules récoltées ou l'analyse directe de l'échantillon, comme l'indique la Figure 2. En fonction des cancers considérés, les avantages et les inconvénients diffèrent légèrement (Powley et al. 2020; A. Collins et al. 2020b).

En effet, pour les cancers de la prostate par exemple, les xénogreffes dérivées du patient sont considérées comme le gold standard des tests précliniques parce qu'elles permettent de maintenir la tumeur d'origine, notamment lors des tests de médicaments. Le principal désavantage réside dans le fait que le système immunitaire de la souris hôte est artificiellement supprimé avant la greffe (pour diminuer les rejets). Or, le système immunitaire est indispensable pour comprendre comment la tumeur est parvenue à y échapper ou pour prédire certaines réponses aux médicaments (Risbridger, Toivanen, et Taylor 2018).

Toujours autour des cancers prostatiques, les cultures ex vivo sont très intéressantes parce qu'elles permettent d'obtenir des taux de prolifération supérieurs à la tumeur in vivo et des taux d'apoptose de l'ordre de 5 à 10% ; permettant dans les deux cas d'étudier l'influence de médicaments sur ces deux paramètres, même si la conservation des échantillons au-delà

de 7 jours est difficile (Risbridger, Toivanen, et Taylor 2018). Dans le cas des cancers de l'endomètre, tous les sous-types ne se prêtent pas à la xénogreffe, et la culture *ex vivo* d'échantillon est difficile à cause des différences de taille, et sont très difficile à standardiser ce qui rend ces méthodes de culture utilisables principalement pour l'immunothérapie mais pas dans du criblage de médicaments (A. Collins et al. 2020a). Dernier exemple, dans le cas des maladies de la rétine, il est très difficile de réaliser des explants sans systèmes de type organes-sur-puce de par la complexité du tissu, et les xénogreffes ne sont possibles qu'avec des primates avec toutes les questions éthiques que cela suscite (Schnichels et al. 2021).

De façon générale, il est possible de dire que les modèles dit 'explants' c'est-à-dire de culture ex vivo, ont connu de nombreuses avancées ces dernières années, permettant de garder l'écosystème tumoral originel pendant un certain temps grâce à des plateformes particulières (Abreu et al. 2020; Silva et al. 2019). Mais cette méthode n'est pas applicable à tous les cancers, notamment certaines étant trop nécrotiques pour permettre une quelconque culture ex vivo. Le modèle de la xénogreffe est intéressant mais inutilisable dans le cadre de l'immunothérapie par exemple, puisque la souris est immunodéprimée pour que la greffe ne soit pas rejetée, sans parler de toute la structure humaine de la tumeur qui est, dans ce cas-là, perdue (Powley et al. 2020).

2.3.2 Biosystèmes sur puces

Les organes sur puces ont pour but de reproduire les fonctions de tissus ou d'organes biologiques de la façon la plus réaliste possible. Les cellules sont mises en cultures dans des chambres et/ou des canaux de façon à générer un tissu ou un organe complet de façon à reproduire sa biologie et sa physiologie d'intégration. De nombreuses recherches ont lieu en ce moment même pour recréer des modèles cardiovasculaires, respiratoires, nerveux, digestifs et endocriniens (Sosa-Hernández et al. 2018). Des dynamiques de stress mécanique, de gradient de concentration et de modelage cellulaire sont ainsi à réaliser pour refléter les caractéristiques physiologiques (Q. Wu et al. 2020). Pour ce faire, des dispositifs micro-

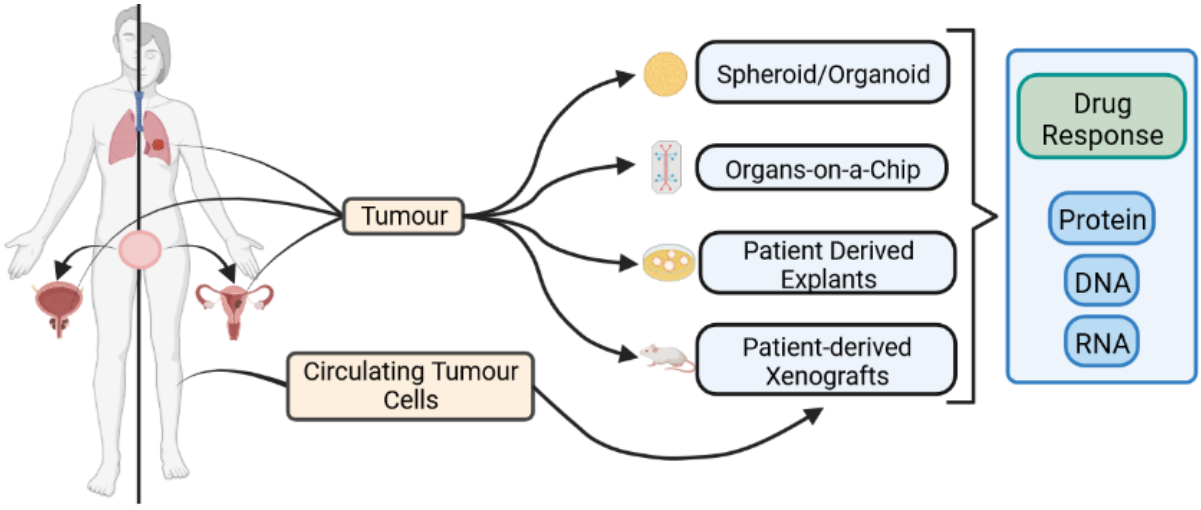


Figure 2 : Schéma des différentes applications des extraits de biopsies et de cellules tumorales circulantes extraites du sang afin d'étudier l'ADN, l'ARN, les protéines modifiées par la forme cancéreuse, et surtout pour réaliser des études de réponse de médicaments. Figure adaptée à partir de Powley et al., 2020 et Collins et al., 2020.

fluidiques assez sophistiqués sont construits, pouvant être classés dans deux principales catégories : les gaufrages chauds et les moules par injection. La première catégorie est similaire à la lithographie par nano impression. Elle est bon marché et a une méthode de fabrication flexible avec des possibilités de construire des motifs nano-imprimés d'une grande résolution. La deuxième correspondant à l'injection d'un matériau dans un moule où il peut couler et prendre la configuration voulue. Elle est utilisable avec de multiples matériaux, du métal au plastique en passant par le verre. Il est cependant recommandé d'utilisé un matériau avec une faible viscosité pour maximiser les contacts avec le moule. Ces deux techniques ont les limitations directement liées aux matériaux utilisés et à leurs caractéristiques physico-chimiques. La bio-impression 3D se développe aussi permettant de rendre la création de dispositifs plus rapides et plus reproductibles (Sosa-Hernández et al. 2018). Les hydrogels sont des matériaux de choix pour la création d'organe-sur-puce puisqu'il est possible d'optimiser la plupart de leurs caractéristiques mécaniques, ainsi que la structure globale du dispositif souhaité (Terrell et al. 2020; Song, Park, et Gerecht 2014).

Ces organes-sur-puces ont permis de comprendre davantage certains mécanismes comme par exemple ceux liés à la création de métastases dans les cancers du seins (Frankman et al. 2022). Ils permettent aussi, au fur et à mesure qu'ils sont complexifiés, de prédire des réponses physiologiques comme la consommation de calcium et la génération de force au sein des tissus cardiovasculaires. De plus, ils peuvent aider à identifier des nouveaux mécanismes d'actions utilisables par les thérapies régénératives en permettant de découpler les effets de multiples facteurs, fait difficilement possible sur les modèles animaux (Tavakol, Fleischer, et Vunjak-Novakovic 2021).

Malgré toutes les dernières avancées sur ces modèles, cela reste très compliqué de recréer un environnement parfaitement reproductible et reproduisant toutes les caractéristiques physiologiques, notamment la vascularisation, l'ajout de fonctions du système immunitaire, etc (Sosa-Hernández et al. 2018).

2.3.3 Sphéroïdes ou Micro-tissus

Un sphéroïde, ou micro-tissu, est un agrégat stable de cellules (Fedi et al. 2022). Il peut être formé de lignées cellulaires immortalisées, de cellules venant de biopsie ou d'un mélange de plusieurs types de cellules. Toutes les cellules ne forment pas de sphéroïdes, notamment les non-adhérentes. En revanche, la plupart des cellules cancéreuses le font.

En étudiant le cancer, un choix doit être réalisé entre les différents modèles existants, notamment en fonction du degré d'exactitude avec la réalité recherchée. Etudier les explants de tumeur permettent des études ex vivo, plus proches de l'in vivo, mais leur disparité et leur conservation les rend difficiles d'utilisation, notamment à grande échelle. D'autres types de modèles comme les tumeurs sur puce permettent un meilleur contrôle de la conservation des échantillons, mais restent compliqués à créer notamment parce qu'ils nécessitent de nombreuses améliorations pour reproduire les caractéristiques physiologiques. Or plus ils sont complexes et moins ils sont reproductibles. Enfin, la culture cellulaire monocouche ne permet pas de mimer les structures et les résistances aux médicaments conférés par des

éléments du micro-environnement des tumeurs et de leur organisation 3D, ce qui est notamment responsable de résultats imprécis dans les tests de performances biologiques des médicaments, principalement réalisés sur des cultures cellulaires 2D.

Ainsi, les modèles de culture cellulaire 3D ont émergé comme une plateforme prometteuse pour faire du criblage de médicaments anticancéreux depuis qu'ils ont démontré un certain mimétisme avec les structures 3D des tissus malins, des micro-tissus cancéreux et de leur environnement (i.e. survie, prolifération, hétérogénéité de l'expression des gènes et multirésistance aux médicaments) (Pinto et al. 2020). C'est pour ces raisons que nous avons choisi de nous intéresser à ce modèle cancéreux pour ce travail de thèse.

3 CARACTERISTIQUES CLES DES SYSTEMES DE CULTURES 3D

3.1 STRUCTURE GLOBALE ET FORMATION

Il est possible d'obtenir des morphologies variées en fonction des modèles, du degré d'exactitude accepté vis-à-vis de la réalité. Les sphéroïdes peuvent être ronds, sous forme de grappes, sous forme d'une masse, etc. De plus, leur taille ainsi que la façon de les former changent leurs caractéristiques. De nombreuses possibilités de créer des sphéroïdes ont été développées de façon à obtenir des tailles et des conditions reproductibles : par exemple, il est possible d'utiliser des gouttes tombant dans un liquide non miscible pour obtenir toujours le même nombre de cellules par goutte et ainsi garantir une homogénéité de taille (Nath et Devi 2016). Il est possible d'utiliser des puits non adhésifs pour forcer les cellules à s'adhérer les unes les autres et ainsi former un sphéroïde. Enfin, en fonction du cancer modélisé, l'utilisation de plusieurs lignées cellulaires dans une même culture (au moins deux) peut permettre de mieux recréer l'environnement.

Un sphéroïde composé uniquement de cellules agglomérées entre elles sous forme de sphère sans temps de culture présentera moins de matrice extracellulaire entre les cellules que lorsqu'il y a un temps de culture de quelques jours : en effet, des interactions entre les cellules se forment et caractérisent la Matrice Extra-Cellulaire (MEC). Cette dernière est composée de jonctions particulières entre les cellules permettant des échanges de protéines, de nutriments, d'ions, etc. La formation de MEC permet au sphéroïde d'obtenir des caractéristiques, comme l'expression de certains gènes, qui sont proches des systèmes in vivo et qui ne dépendent pas nécessairement de la taille mais plutôt de la façon dont le sphéroïde est mis en culture.

3.2 GRADIENTS PRESENTS DANS LES SPHEROÏDES

Trois grands types de gradients sont impliqués dans le développement des sphéroïdes. Ils sont associés à la pression partielle de dioxygène, l'accumulation des déchets et les métabolites. Ils dépendent de la taille et des lignées utilisées : plus le diamètre est grand, plus les gradients seront importants et impacteront l'organisation des cellules au sein d'un sphéroïde. La pression partielle de dioxygène est plus importante en surface du sphéroïde qu'en son centre, ce qui est principalement dû à l'environnement extracellulaire créer par les cellules elles-mêmes, rendant la structure compacte (Raza et al. 2017). Pour les mêmes raisons, les métabolites sont plus présents en surface qu'au centre. A l'inverse des déchets cellulaires vont s'accumuler au centre du sphéroïde. La conséquence de ces différents gradients est une organisation des cellules par niveaux concentriques. Les cellules au centre forment le cœur hypoxique composée de cellules nécrosées, le niveau du milieu étant des cellules dites latentes et le niveau le plus externe formant la couche proliféatrice. Il est communément admis qu'un cœur nécrotique commence à se former à partir d'un diamètre d'environ 250 µm (Nath et Devi 2016; Pinto et al. 2020; Rizwan et al. 2019).

3.3 CINETIQUE DE CROISSANCE DES TUMEURS

La cinétique de formation des tumeurs est étudiée depuis des années : elle est composée de trois grandes phases. D'abord une formation avasculaire, accompagnée d'une croissance exponentielle de la taille de la tumeur jusqu'à atteindre un plateau. Ce plateau se termine là où commence l'angiogenèse, c'est-à-dire lorsque la couche de cellules la plus externe se différentie en cellules invasives. Enfin la dernière phase correspond au processus métastasique avec croissance accompagnée de vascularisation (Teresa et Gabriella 2008). Les modèles mathématiques qui régissent ces différentes étapes de croissance ont évolué avec le temps, partant de modèles purement exponentiels (Demicheli et al. 1989; Demicheli, Prates, et Foroni 1991) qui ne pouvaient prédire correctement que la première partie de la croissance tumorale, vers des modèles plus complexes qui prennent en compte les délais de croissance observés notamment pour des tumeurs avasculaires, ou comportant des cœurs nécrotiques (Fory et Bodnar 2003; Xu, Bai, et Zhao 2012; Xu et Bai 2015; Xu et Huang 2014). La Figure 3 constitue une conclusion en rassemblant les principales caractéristiques des sphéroïdes 3D qui sont cruciales pour leur application dans le criblage des thérapeutiques anticancéreuses.

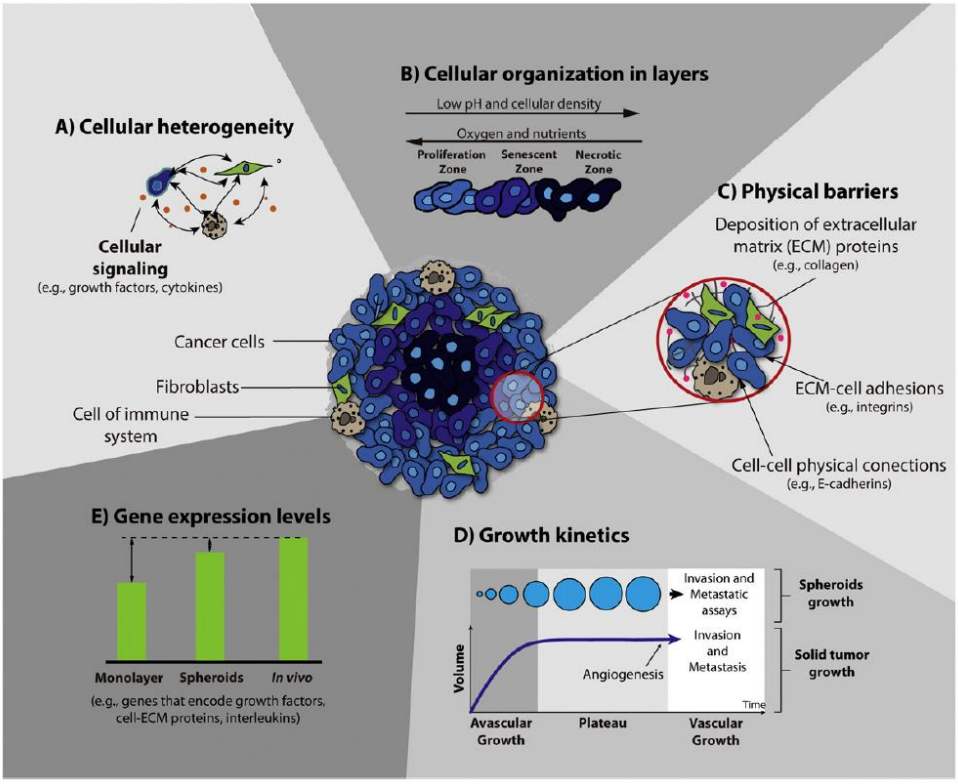


Figure 3 : Représentation schématique des principales caractéristiques des sphéroïdes, un modèle du cancer. A) Leur hétérogénéité cellulaire (cellules cancéreuses et stromales) reproduit la distribution cellulaire trouvée dans les tumeurs in vivo. B) Leur structure 3D organisée en trois couches principales (couches prolifératives, sénescentes et nécrotiques), avec un gradient caractéristique d'oxygène, de nutriments, de pH et de densité cellulaire qui est similaire à celui observé dans les tumeurs solides chez les humains C) Leurs barrières physiques établies en raison de l'existence d'interactions ECM-cellules et cellules-cellules, résultant du dépôt d'ECM. D) Leur corrélation entre la cinétique de croissance des sphéroïdes et celle des tumeurs solides : croissance initiale exponentielle (phase de croissance avasculaire) suivi d'un état de plateau. E) Enfin, leur représentation des modèles d'expression génétique obtenus à partir de cultures cellulaires monocouches, de sphéroïdes et de tumeurs solides in vivo. Reproduction de Costa et al., 2016

4 ELABORATION DES SPHEROÏDES TUMORAUX

De nos jours, différentes méthodes existent pour assembler des cultures cellulaires 3D. Il est possible de les différencier en deux grandes classes : (i) cultures cellulaires sans architectures, uniquement dans des puits non adhérents et (ii) cultures cellulaires basées sur des structures dont certains exemples sont représentés dans la Figure 4 (Nunes et al. 2019; Rizwan et al. 2019). Il existe de nombreuses techniques de culture en système 3D en fonction de la taille voulue, la morphologie et les caractéristiques biologiques recherchées.

4.1 CULTURE SANS ARCHITECTURES PREALABLES

La méthode la plus simple consiste en l'utilisation de plaques à puits à fonds plats ou fonds ronds qui sont traitées pour être non-adhérentes. Les cellules ne pouvant adhérer à la surface, elles s'adhèrent les unes aux autres et forment des sphéroïdes. Cependant les plaques non adhérentes sont souvent assez coûteuses. Pour y pallier, certains font leur propre traitement de surface avec de l'agarose par exemple dans des plaques à puits (Pérard et al. 2013; M. T. Tsai, Huang, et Lei 2020). Une autre technique de fabrication de sphéroïdes consiste en l'utilisation de gouttes suspendues contenant des cellules. La goutte étant suspendue, les cellules se positionnent au fond de la bulle de milieu, comme présenté sur la partie droite de la Figure 4, et forment en quelques jours un sphéroïde (Foty 2011; Timmins et Nielsen 2007).

4.2 CULTURE SUR DES STRUCTURE EN HYDROGELS

Les hydrogels permettent de créer des structures 3D pour étudier les derniers stades de développement des tumeurs, c'est-à-dire l'angiogenèse et la vascularisation. En effet, le gel permet de créer des architectures sur lesquelles les cellules peuvent adhérer. Il doit être biocompatible ainsi que poreux pour laisser les nutriments naviguer et atteindre les cellules. Leur rigidité et la façon de les fonctionnaliser, pour apporter des marqueurs particuliers par exemple, doivent être savamment contrôlées parce qu'elles peuvent modifier la prolifération, la différentiation, etc (H. Liu et al. 2020). Il est possible de classer les hydrogels en deux catégories : les naturels et les synthétiques. Les premiers sont extraits de MEC naturelles comme le Matrigel par exemple, dont le principal constituant est la laminine. Le collagène et le fibrinogène sont aussi des constituants naturels de certaines MEC qui permettent de créer des modèles très proches des tumeurs malignes au-dessus de 200 µm de diamètre. Ils permettent de réaliser des études d'invasivité des tumeurs notamment (Veelken et al. 2017). Le principal inconvénient de ces hydrogels tient dans leur variabilité d'un lot à l'autre, et la difficulté de maîtriser leur rigidité. Des hydrogels synthétiques ont été développés afin de maîtriser leur rigidité, les sites d'adhésion cellulaire, ou encore leur dégradabilité à partir des hydrogels naturels. L'acide hyaluronique s'est démontré déterminant en tant que matrice extracellulaire dans la progression et l'invasivité d'une tumeur (Song, Park, et Gerecht 2014). Le PEG s'est montré intéressant par sa grande teneur en eau, sa biocompatibilité, sa neutralité

chimique et ses nombreuses possibilités de fonctionnalisation, ce qui en fait un polymère particulièrement malléable dans ses applications possibles. Il a notamment permis la co-culture pendant trois semaines d'hépatocytes avec des cellules endothéliales (Otsuka et al. 2005).

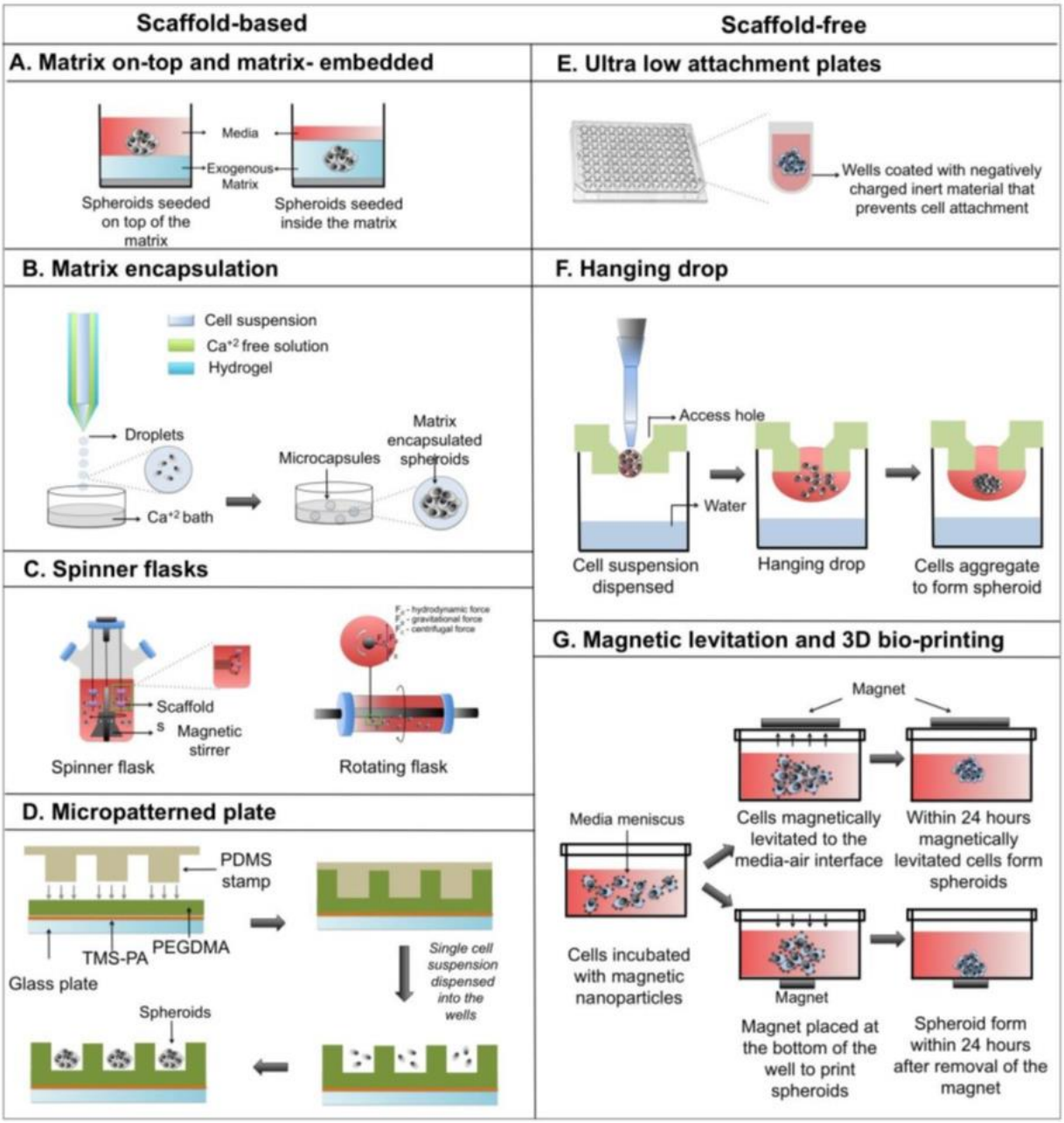


Figure 4 : Représentation schématique des principales méthodes de fabrication de sphéroïdes selon si la méthode nécessite une structure préalable ou pas. (A) Méthode avec matrice : soit sous le dépôt du sphéroïde, soit avec le sphéroïde intégré dans la matrice. (B) Encapsulation dans une matrice. (C) Méthode utilisant des flasques dites tournantes, où le milieu est en rotation permanente pour que les cellules adhèrent entre elles. (D) Fabrication de plaque à puits non adhésifs grâce à des moules, en PDMS notamment. (E) Plaque à puits traitées pour être non-adhésives. (F) Méthode dites Hanging Drop de croissance des cellules dans une goutte. (G) Méthode utilisant la lévitation magnétique et la bio-impression 3D. Reproduit à partir de Nath et Devi, 2016.

4.3 CULTURE GRACE A DES SYSTEMES MICROFLUIDIQUES

La micro-fluidique permet de créer des structures dans lesquelles les sphéroïdes peuvent être à la fois mis en culture et étudié grâce à une partie fluidique apportant les nutriments essentiels à leur croissance et survie (Moshksayan et al. 2018; Khot et al. 2019). Le polydiméthylsiloxane (PDMS) est souvent utilisé parce qu'il est bon marché, étanche (au liquide, pas à l'oxygène), biocompatible et permet une précision des structures jusqu'au micromètre grâce à l'utilisation de moules. La méthode commence souvent par la création d'un moule soit par imprimante 3D soit par micro-fabrication, qui permettra ensuite de couler le PDMS à l'intérieur et de le démouler pour obtenir la structure voulue. Une multitude de structures existent en fonction de l'application, la taille des sphéroïdes et les analyses souhaitées. Les systèmes les plus simples utilisent uniquement des micro-puits non adhésifs, avec éventuellement des formes particulières pour fabriquer des puces avec de nombreux sphéroïdes (Anada et al. 2012; Yeon et al. 2013; Kwapiszewska et al. 2014; L. Y. Wu, Di Carlo, et Lee 2008). D'autres équipes mettent en place un système permettant le criblage de médicaments avec des concentrations en gradient dans une seule puce permettant l'évaluation de la molécule testée rapidement (Mulholland et al. 2018). D'autres enfin, développent des systèmes fluidiques piégeant, par le flux, des cellules à la base en suspension dans des cavités pour la formation de sphéroïdes (Hsiao et al. 2009; J. Y. Kim et al. 2015; Ota et Miki 2011). Le tout donnant la possibilité d'évaluer la résistance de ces sphéroïdes face à des molécules anticancéreuses dans un flux permanent (Ruppen et al. 2014).

La micro-fluidique permet aussi de créer de nombreux sphéroïdes facilement manipulables, de tailles et de morphologies reproductibles dans des quantités importantes. En effet, grâce à une double émulsion de gouttes dans des liquides non-miscibles, il est possible de piéger des cellules dans leur milieu dans une goutte d'huile, elle-même piégée dans une goutte d'un surfactant comme le poly(éthylène glycol) (PEG) fonctionnalisé par exemple. En contrôlant la concentration de cellules dans le milieu, c'est le nombre de cellules par goutte et ainsi la taille du sphéroïde qui est maitrisée. Il s'agit d'une méthode permettant de créer de nombreux sphéroïdes en très peu de temps (Chan et al. 2013).

4.4 CONCLUSIONS

Les méthodes de culture et de fabrication de dispositifs de culture 3D sont en expansion et donc de nouvelles méthodes sont développées comme par exemple les méthodes de bio-impression (Tseng et al. 2015). Elles vont permettre, à terme, de complexifier les modèles pour les rapprocher de la réalité sans pour autant augmenter la difficulté de fabrication, ni diminuer la reproductibilité. La méthode qui a été choisie pour la fabrication des sphéroïdes dans ces travaux de thèse est une méthode hybride entre une méthode sans structure préalable mais qui a besoin d'un hydrogel pour former des puits non adhésifs. Elle sera détaillée dans le Chapitre 2.

Nous allons à présent faire un état des lieux des méthodes de caractérisations de sphéroïdes.

5 PRINCIPALES TECHNIQUES DE CARACTERISATION DES SPHEROÏDES TUMORAUX

5.1 PREDICTION DE CINETIQUE DE CROISSANCE DES SPHEROÏDES

Parmi les toutes premières études réalisées sur les sphéroïdes se trouvaient de nombreuses analyses mathématiques permettant de comparer leur croissance avec les tumeurs réelles. En effet ce modèle 3D étant assez proche de la réalité, il a permis de comparer les différentes caractéristiques des tumeurs telles que les différentes étapes de croissance menant aux différentes couches de cellules au sein même de leur structure et celles des sphéroïdes pour en déduire des modèles plus proches des cas cliniques (Conger et Marvin 1983; Demicheli, Prates, et Foroni 1991; Demicheli et al. 1989). Le but recherché est la création de modèles mathématiques pour de la modélisation par ordinateur et prédire l'évolution d'un cancer en fonction des paramètres caractéristiques de son environnement (Düchting, Ulmer, et Ginsberg 1996). Depuis les premières modélisations, de nombreuses améliorations ont été réalisées afin de prendre en compte les paramètres qui peuvent expliquer des délais dans le développement des tumeurs non vascularisées (Ward et King 1997; Xu, Bai, et Zhao 2012; Xu et Huang 2014; Xu et Bai 2015), ou dans l'influence des paramètres tels que le pH et les ions lactate (Al-Husari, Murdoch, et Webb 2013).

5.2 TECHNIQUES DE CARACTERISATIONS OPTIQUES

La caractérisation biologique passant par un contrôle de la morphologie ou recherchant la présence de certaines caractéristiques, l'observation est l'un des premiers éléments d'analyse. Il est ainsi facilement compréhensible que la méthode la plus utilisée dans la caractérisation des sphéroïdes tumoraux soit la microscopie, même si elle ne permet pas toujours de faire des caractérisations quantitatives. La microscopie électronique à balayage (MEB) a permis la découverte de certaines organelles à l'intérieur des cellules ouvrant la voie aux premières expériences modernes sur la biogénèse (Mullock et Luzio 2000). Différents exemples sont représentés dans la Figure 5.

5.2.1 Optique par fluorescence

Les éléments constitutifs d'un système biologique qui permettent son fonctionnement, tels que les éléments de MEC, les gènes ou les protéines, ne sont pas visibles sans marquage préalable. Par exemple, les protéines peuvent être marquées par des anticorps spécifiques qui eux-mêmes seront marqués par des anticorps fluorescents. L'utilisation de deux types d'anticorps permet de mieux adapter les expériences et d'augmenter un peu le signal observé ensuite en microscopie confocal notamment. La modification génétique des cellules avant toute création de sphéroïdes permet de rendre fluorescent ou luminescent différents « objets biologiques » en fonction de l'étude réalisée comme par exemple : des

organelles, la membrane, le cytoplasme, un récepteur recherché ou surexprimé, ou même une protéine générée à la suite de l'expression d'un gène cible.

La caractérisation des sphéroïdes peut se faire sous plusieurs angles. La vérification de la viabilité et de la morphologie des cellules en fonction de leur place dans le sphéroïde avec des marqueurs d'apparition de MEC comme l'actine et l'albumine (Otsuka et al. 2005; Pandya et al. 2014; Tseng et al. 2015; Raza et al. 2017; Kessel et al. 2017; Tung et al. 2011; L. Y. Wu, Di Carlo, et Lee 2008; H. Liu et al. 2020; Ruppen et al. 2014). Ces même marqueurs peuvent servir de pointeur des cellules individuelles et ainsi, permettre de suivre l'invasivité d'une masse tumorale (Veelken et al. 2017). Le suivi des différents gradients d'hypoxie qui permet d'évaluer la présence ou non de cœur nécrotique est aussi possible (Ducommun et al. 2013). Les activations de la prolifération, de l'adhérence des cellules, c'est à dire les changements de phénotypes en somme, peuvent être suivis et donner des indications sur les processus d'angiogenèse (Amann et al. 2014; Loessner et al. 2013).

5.2.2 MEB

Les observations au MEB demandent une fixation et surtout un traitement de surface métallique pour permettre une visualisation puisqu'il faut une surface conductrice. Cette méthode apporte une précision plus importante en 3D que sur les imageries confocales classiques pour un prix raisonnable. L'étude de la morphologie en fonction de différences de culture a ainsi été réalisée (Pérard et al. 2013; Amann et al. 2014; Teresa et Gabriella 2008). Il s'agit d'une méthode à privilégier lors des études de pénétration et de distribution de nanoparticules au sein de sphéroïdes dans leur globalité (Agarwal et al. 2015), ou bien dans des recherches plus spécifiques à l'intérieur même des structures biologiques (Mollo et al. 2020).

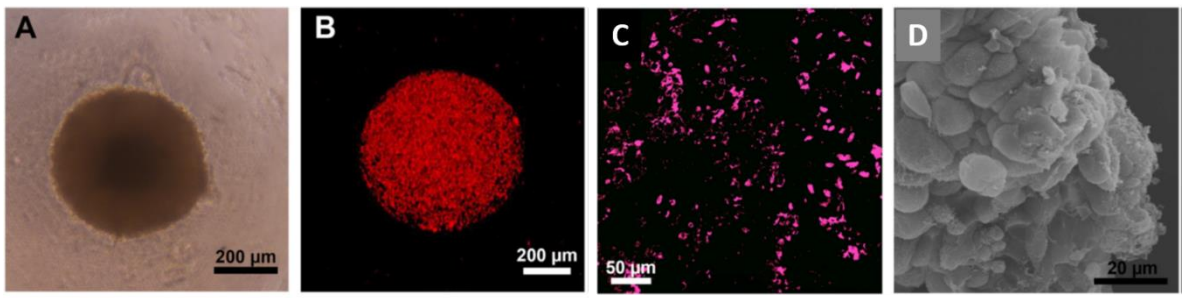


Figure 5 : Photos de sphéroïdes avec les différentes méthodes d'imagerie des sphéroïdes. (A) Vue du dessus d'un sphéroïde par microscopie à contraste de phase. (B) Image d'une section d'un sphéroïde obtenue par microscopie confocale à balayage laser. (C) Evaluation de l'expression de E-cadherine dans un sphéroïde 3D par imagerie confocale à balayage laser. (D) Image obtenue par microscopie électronique à balayage de la surface d'un sphéroïde. Reproduit à partir de Costa et al. 2016.

5.3 AUTRES TYPES D'ANALYSES DES SPHEROÏDES

5.3.1 Cytométrie en flux

La cytométrie en flux est une méthode dans laquelle les cellules sont en suspension pour analyser les cellules individuellement. Par conséquent, les sphéroïdes ont besoin de subir un traitement de désintégration cellulaire pour obtenir une suspension cellulaire. Pour ce faire, les sphéroïdes sont collectés, généralement par centrifugation, et traités avec une ou plusieurs enzymes (Carver, Ming, et Juliano 2014; Ivascu et Kubbies 2006; Khaitan et al. 2006). La cytométrie en flux a principalement été utilisée pour quantifier l'assimilation par les cellules de médicaments ou de nanoparticules par la quantification de l'apoptose (Costa et al. 2016). Mais elle a aussi permis de faire des analyses de cycle cellulaire (Khaitan et al. 2006).

5.3.2 Présence et expression de gènes

Western Blot (aussi appelé immunoblotting) et qRT-PCR sont des techniques très largement utilisées pour évaluer la présence de protéines et des motifs d'expression de gènes. Le Western Blot est utilisé pour évaluer la présence de certaines protéines dans le lysat de cellules. Pour ce faire, les sphéroïdes 3D sont lysés par des détergents chimiques ou des combinaisons avec des lyses mécaniques (Mahmood et Yang 2012; Khaitan et al. 2006). Les méthodes de lyses doivent être choisies en fonction de l'endroit supposé, de la protéine recherchée (cytoplasmes, membranes ou noyaux) et leur temps d'incubation peut être largement augmenté à cause de la structure 3D d'un sphéroïde. Le principal avantage du Western Blot est sa sensibilité même en présence de très faibles concentrations de protéines. Cependant cette méthode est semi-quantitative, et peut être complétée avec une méthode quantitative telle que la qRT-PCR. Cette dernière est utilisée pour quantifier l'expression de gène en synthétisant l'ADN complémentaire transcrit à partir de l'ARN (Fraga, Meulia, et Fenster 2008). Ces méthodes permettent d'identifier des protéines jouant des rôles essentiels

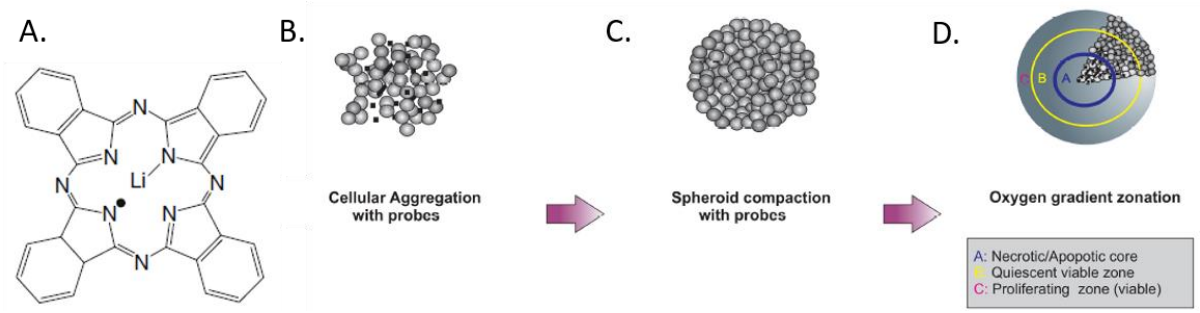


Figure 6 : Schéma de concept de la méthode de résonance paramagnétique électronique. (A) La molécule paramagnétique de lithium Phthalocyanine. (B) La 1ère étape de cette méthode demande la mise en culture avec la molécule paramagnétique. (C) La culture du sphéroïde permet la compaction avec la molécule permettant la détection. (D) Enfin, les sondes sont donc également réparties dans le sphéroïde et uniquement les sondes qui sont au contact direct de l'oxygène seront mesurées. Reproduit à partir de Langan et al., 2016 et Hyodo et al.2010.

dans la progression des tumeurs telles que les intégrines, les cadhérines, etc (Costa et al. 2016).

5.3.3 Mesure de gradient d'oxygène par résonance paramagnétique électronique

La Résonance Paramagnétique Electronique est la méthode la plus fiable pour mesurer l'oxygène parce qu'elle mesure les radicaux libres et l'oxygène dans les tissus grâce à des interactions physiques entre des molécules sondes paramagnétiques ayant été intégrées aux sphéroïdes pendant son développement (Langan et al. 2016). La molécule la plus utilisée est le lithium phtalocyanine (LiPc), voir Figure 6 (A), parce qu'elle permet d'interagir avec les deux électrons non appareillés de l'oxygène à son état fondamental. Cette interaction est sensible à la concentration en oxygène puisque sensible au taux de relaxation du spin des électrons de LiPc. Cette méthode est très peu invasive, non toxique, très sensible, répétable et permet de faire une mesure locale de la présence ou non d'oxygène (Hyodo et al. 2010). Cette méthode a permis d'obtenir de façon précise qu'un sphéroïde d'un diamètre < 150 µm présente moins de 2% de cellules sénescentes (hypoxique ou nécrotique) (Langan et al. 2016).

5.3.4 Caractérisation mécanique des sphéroïdes : mesure par déformation

Les caractéristiques mécaniques d'un sphéroïde dépendent de la composition de la MEC présente entre les cellules et de la quantité de cellules nécrotiques au sein d'un sphéroïde. Cependant l'étude de ces propriétés avaient plutôt été orientée vers les

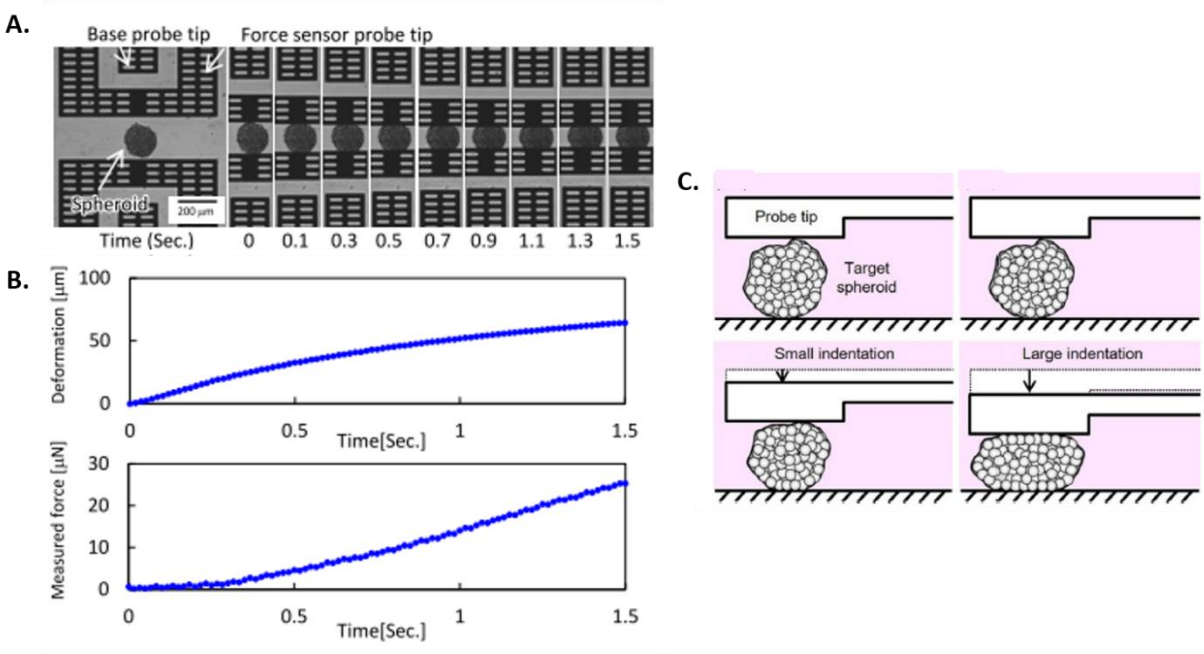


Figure 7 : Caractérisations mécaniques des sphéroïdes par mesure de déformation. (A) et (B) Exemple de caractérisation mécanique d'un sphéroïde de cellules souches d'endothélium de veine ombilicale humaine (HUVEC/MSC). (A) Série de photographies pendant la mesure de la courbe de déformation. (B) Courbe de force en fonction du temps obtenue. (C) Une illustration de l'idée de base d'une autre approche pour identifier les caractéristiques mécaniques d'un sphéroïde. L'approche conventionnelle impliquant une petite indentation et l'approche proposée, qui utilise une grande indentation à l'aide d'une sonde de capteur de force avec une large gamme de mesure. Reproduit à partir de Ito et al., 2016 et Sakuma et al., 2017.

changements d'environnement que sur le sphéroïde lui-même. Certaines équipes se sont attelées à cette tâche en appliquant une force mécanique directement sur la masse tumorale pour en mesurer la déformabilité : voir Figure 7. et en corrélant les résultats obtenus avec d'autres méthodes de caractérisation pour comprendre ce que représentent les variations de tailles de sphéroïdes au cours de leur développement ou la liaison avec les quantités de myosine (Ito et al. 2016; Sakuma et al. 2017). Comme il s'agit d'une méthode assez récente, elle ne sera pas plus détaillée ici.

6 TECHNIQUES DE CARACTERISATIONS ELECTRIQUES DES SPHEROÏDES

6.1 L'INTERACTION DES CHAMPS ELECTROMAGNETIQUES AVEC LE VIVANT

La caractérisation de la matière biologique à l'aide de la spectroscopie diélectrique ou d'impédance électrique est une alternative prometteuse aux méthodes actuellement utilisées : elle ne nécessite pas de marquage, ni de rayonnement ionisant, et peut être non invasive. En outre, il existe un contraste important dans la façon dont les différents matériaux biologiques absorbent, réfléchissent et transmettent les ondes électromagnétiques (EM) (Mehrotra, Chatterjee, et Sen 2019). Cela est dû à leurs propriétés diélectriques. Les propriétés diélectriques sont décrites par le paramètre dépendant de la fréquence appelé permittivité complexe $\varepsilon(f)$, qui exprime la façon dont le matériau répond à un champ électrique oscillant externe. Comme le spectre de permittivité de chaque matériau biologique est différent, il agit comme une empreinte électromagnétique (EM). La permittivité est un paramètre complexe dont le spectre de fréquence présente des phénomènes de relaxation et de résonance, sa forme peut s'écrire comme suit :

$$\varepsilon(f) = \varepsilon'(f) + j\varepsilon''(f) \quad (1)$$

Où $\varepsilon'(f)$ est la partie réelle de la permittivité, et $\varepsilon''(f)$ la partie imaginaire de la permittivité : toutes deux dépendant de la fréquence.

Une représentation schématique de la partie réelle est représentée à la Figure 8. La partie réelle de la permittivité décrit la façon dont les moments des dipôles électriques formés par les charges polarisées à l'intérieur du matériau s'alignent sur le champ électrique. La partie imaginaire de la permittivité décrit les pertes EM dans le tissu. Ces pertes EM peuvent être considérées comme provenant de la friction causée par le mouvement des charges alignées sur le champ électrique. Une explication intuitive des relaxations de la partie réelle de la permittivité peut être écrite ainsi : un champ électrique oscillant externe provoque l'alignement des moments dipolaires (dû au mouvement des électrons, atomes, molécules, ...) à l'intérieur du matériau sur le champ électrique. Lorsque l'inertie des charges les empêche de suivre les oscillations du champ électrique, leur contribution au champ électrique total tombe à zéro. Ceci peut être vu dans le spectre comme une chute de la partie réelle de la permittivité et est appelé une relaxation (Aldhaeebi et al. 2020). L'événement de relaxation ne se produit pas à une fréquence unique mais sur une plage, car la matière biologique est très hétérogène et les différents atomes, molécules, etc. ont des fréquences de relaxation légèrement différentes. Les divers mécanismes de relaxation sont déterminés par des mécanismes de polarisation distincts pour les différents constituants de la matière. Ainsi, le spectre informe sur les différents constituants de la matière dans différentes zones de fréquence. Il est essentiel de comprendre les principes fondamentaux qui sous-tendent les phénomènes de relaxation et de résonance pour comprendre comment extraire des informations sur l'état biologique et physiologique d'un matériau à partir du spectre en fréquences.

En effet, dans la gamme des kHz, l'α-dispersion venant du mouvement d'espèces ioniques selon la polarité des électrodes mène à des permittivités importantes jusqu'à 1 MHz comme représentée sur la Figure 8 (Schwan 1983). La β-dispersion, ayant lieu dans la gamme des MHz, correspond à la polarisation interfaciale de certains composants cellulaires tels que la membrane plasmique. La polarisation de protéines et d'autres molécules organiques peuvent aussi contribuer à la β-dispersion (Gabriel, Gabriel, et Corthout 1996). Il est important de noter l'impossibilité pour les ondes électromagnétiques de pénétrer à l'intérieur de la cellule dans ces gammes de fréquence (jusqu'aux MHz) à cause de la membrane plasmique qui joue un rôle de capacité : représenté par le premier schéma de la Figure 8.

La γ-dispersion, ayant lieu au-delà de 1GHz, est essentiellement due à la relaxation des molécules d'eau présentes dans le cytoplasme et dans le milieu externe à la cellule (Cole et Cole 1941). A partir d'une certaine fréquence (vers 18 GHz pour les molécules d'eau à température ambiante), les molécules présentant un moment dipolaire ne parviennent plus à suivre la réorientation imposée par le champ électrique appliqué, ce qui induit une relaxation des molécules et donc de la permittivité. Dans ces gammes de fréquences en revanche il est possible de sonder l'intérieur des cellules, la membrane y devenant transparente comme le représente le deuxième schéma de la Figure 8.

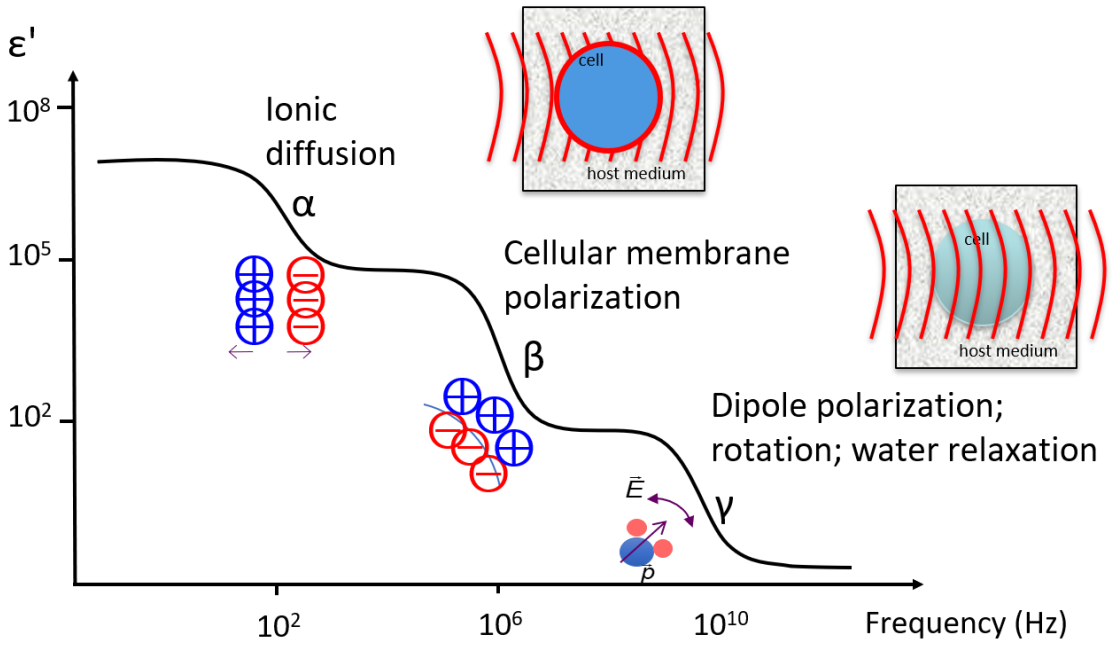


Figure 8: Partie réelle de la permittivité en fonction de la fréquence avec une représentation des interactions des ondes électromagnétiques avec le vivant. Reproduit à partir de Artis et al., 2015.

6.2 EN TRES BASSE FREQUENCE : L'AMPEROMETRIE

Les basses fréquences correspondent à la gamme commençant à quelques Hertz jusqu'à quelques centaines de Hertz (Hz) (Mehrotra, Chatterjee, et Sen 2019). Elles permettent principalement de faire de la mesure de signal déjà émis par les cellules, donc l'analyse de cellules cardiaques par exemple. Ces études se font généralement grâce à des systèmes de multi-électrodes planaires et thermostatées. Un exemple est représenté sur la Figure 9 a). Les analyses peuvent se dérouler pendant plusieurs semaines (Daus et al. 2011; Daus, Layer, et Thielemann 2012).

Si les électrodes sont fonctionnalisées, le lactate ou le glucose à la surface du sphéroïdes peuvent être monitorés ce qui permet d'évaluer la consommation d'énergie biologique faite par le bio-objet (Misun et al. 2016). Dans ces gammes de fréquence, il est aussi possible d'appliquer une tension constante entre des électrodes couvrant la surface à analyser afin de l'imager pour y réaliser de la détection de cancer du sein notamment ; dans ce cas, une large électrode de référence ailleurs sur l'échantillon est nécessaire (Zou et Guo 2003).

6.3 SPECTROSCOPIE DIELECTRIQUE

La méthodologie générale consiste en (1) la mesure de la réflexion et/ou de la transmission des ondes EM à travers le matériau testé ou la mesure de son impédance dans des gammes de fréquences plus basses (jusqu'au MHz) (Alexander, Price, et Bhansali 2013), suivie par (2) une conversion mathématique en permittivité diélectrique. D'une certaine façon, la spectroscopie diélectrique va plus loin dans l'analyse des données que la spectroscopie d'impédance avec la détermination des propriétés diélectriques de la matière et donc l'obtention de la permittivité. Cette conversion mathématique en permittivité diélectrique dépend de la configuration géométrique des mesures et de la méthode d'étalonnage et ne sera pas discutée en détail ici. Le principe de base est que les résultats de mesure sont « désenrobés », c'est-à-dire que les effets de la configuration sont supprimés, jusqu'à ce que seul l'effet de la permittivité du matériau testé soit visible. Il est également possible de comparer les permittivités obtenues à des modèles préexistants tels que celui de Cole-Cole ou les équations de Debye (Cole et Cole 1941).

6.3.1 Gamme des MHz – Mesure de l'impédance

Les fréquences concernées par cette partie commencent à quelques MHz jusqu'à 1 GHz, ainsi il s'agit de l'observation de la β-dispersion correspondant à l'interaction entre les ondes électromagnétiques et les membranes cellulaires.

Plus expérimentalement parlant, l'impédance électrique d'un matériau est définie comme l'opposition au flux de courant alternatif (CA) (Alexander, Price, et Bhansali 2013). La méthode de spectroscopie électrique d'impédance standard applique une tension alternative $v(t)$ au matériau testé sur une large gamme de fréquences tel que :

$$v(t) = V_0 cos(\omega t), \quad (2)$$

où V_0 et ω représentent l'amplitude de la tension et la pulsation, respectivement. Le courant résultant est alors :

$$i(t) = I_0 sin(\omega t + \theta), \quad (3)$$

où I_0, l'amplitude du courant, est ensuite mesurée. Afin de rester dans la région de réponse linéaire, une petite tension, typiquement inférieure à 25mV est utilisée. L'impédance électrique est définie comme le ratio complexe entre la tension et le courant :

$$Z(\omega) = \frac{v(t)}{i(t)}. \quad (4)$$

Où le module de Z et sa phase θ peuvent être calculés, parce que pouvant être exprimé par :

$$|Z(\omega)| = \frac{V_0}{I_0} \quad (5)$$

$$\theta = tan^{-1}\left(\frac{v(t)}{i(t)}\right). \quad (6)$$

Afin d'évaluer un système à l'aide de la spectroscopie électrique d'impédance (EIS), il faut utiliser une méthode de modélisation pour expliquer le comportement du système. Cette méthode peut être abordée de deux façons : en utilisant une formule empirique qui décrit explicitement le système ou, plus communément, en utilisant un modèle de circuit équivalent qui attribue des éléments de circuit passif aux différents composants du système. Comme les systèmes réels présentent rarement des capacitances idéales (indépendantes de la fréquence), les éléments capacitifs idéaux ne peuvent pas être utilisés (indépendantes de la fréquence). Les éléments capacitifs idéaux des modèles de circuits équivalents sont remplacés par des éléments à phase constante. La formule de la phase constante est

$$Z_{cpe} = \frac{1}{Y^0 j\omega^\alpha}. \quad (7)$$

Où α est un facteur entre 0 et 1 et Y^0 est la valeur de l'élément à phase constante, correspondant à la capacitance idéale (C) quand α est égal à 1 (Alexander, Price, et Bhansali 2013).

Lorsque ces procédures expérimentales sont appliquées à des systèmes biologiques, y compris les cellules entières et les modèles cellulaires, on parle de bioimpédance électrique. Des microélectrodes ont été développées pour l'analyse de cellules uniques et de cultures cellulaires. Dans ces essais cellulaires, une faible tension de signal est appliquée aux microélectrodes. La faible tension de signal, outre le fait qu'elle préserve la linéarité, permet également de garantir que le champ électrique reste faible. Ceci est essentiel pour maintenir la viabilité cellulaire et pour minimiser l'impact sur le milieu cellulaire, ce qui fait de l'analyse de la bioimpédance une technique non destructive pour l'analyse cellulaire (Alexander, Price, et Bhansali 2013).

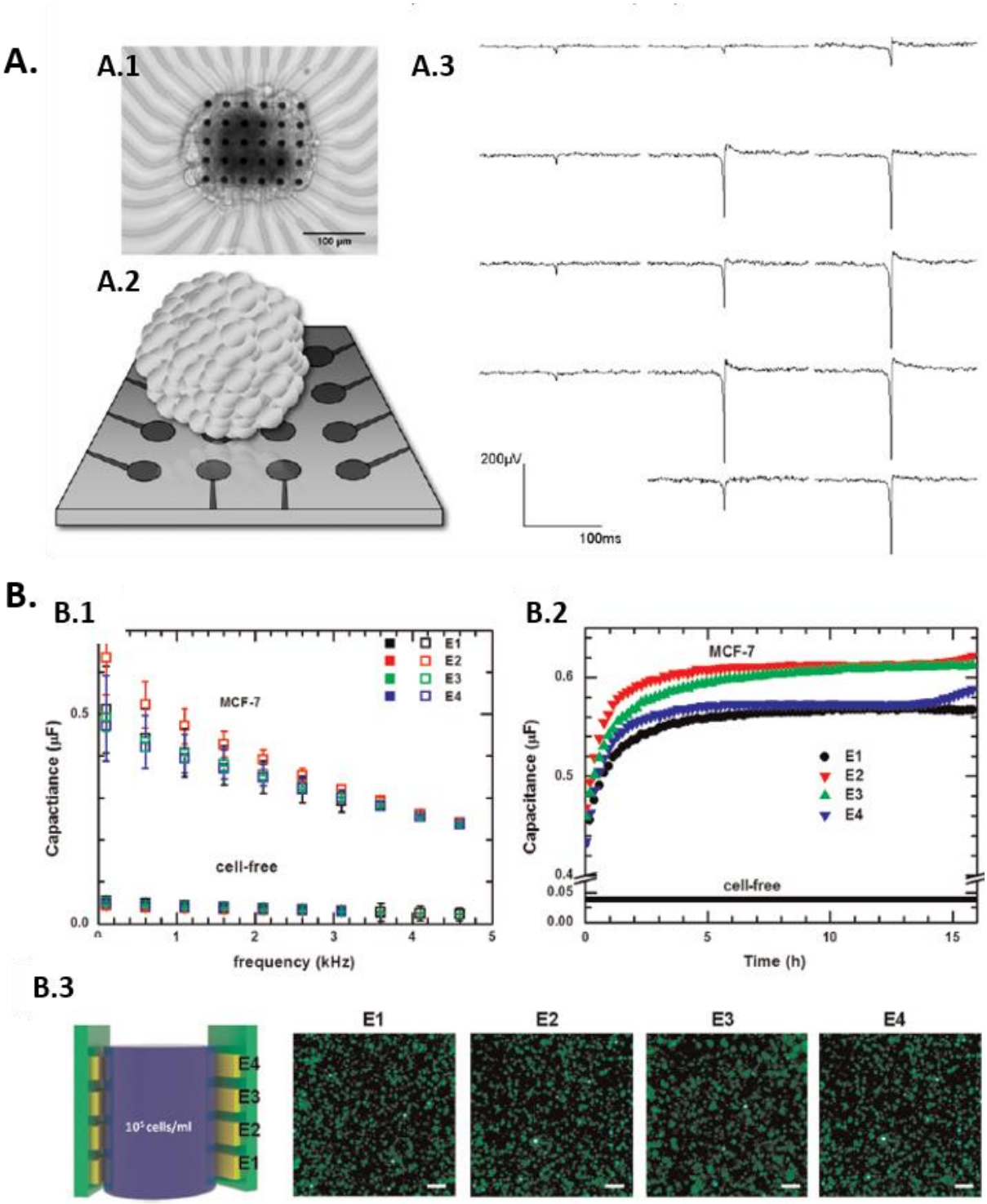


Figure 9 : Deux exemples de dispositifs permettant des caractérisations électriques de sphéroïdes. (A) Réseaux de micro-électrodes permettant des enregistrements extracellulaires. (A.1.) Sphéroïdes en contact avec le réseau de microélectrodes, (A.2.) Schéma 3D (pas à l'échelle) d'un sphéroïde posé sur le réseau d'électrodes. (A.3.) les mesures réalisées de sphéroïdes de lignées cellulaires cardiaques. Reproduit à partir de [78] (B) Mesure de la capacitance des cellules de la lignée MCF-7 (cancer du sein) transfectée pour exprimer la molécule fluorescente GFP (= lignée GFP-MCF-7) dans une matrice d'alginate. (B.1) Capacitance en fonction de la fréquence pour les différentes électrodes 1-4. (B.2) Capacitance représentée en fonction du temps des différentes électrodes 1-4. (B.3) Image de fluorescence optique des cellules GFP-MCF-7. Reproduit à partir de Daus et al., 2012 et Lee et al., 2016.

La spectroscopie électrique d'impédance permet notamment d'étudier la perméabilité des cellules endothéliales et épithéliales avec le calcul de la résistance transépithéliale, caractéristique de la barrière tissulaire. En fonction du model tissulaire étudié, de nombreuses dispositions d'électrodes existent : sous forme de microcavité avec les électrodes sur les bords ou sous forme de canal fluidique avec des électrodes placées en dessous et/ou au-dessus (Gerasimenko et al. 2020). Cette technique de mesure permet aussi la différentiation de lignées cellulaires grâce à des systèmes de multi-électrodes augmentant la résolution spatiale (Heileman, Daoud, et Tabrizian 2013). Thielecket et al. ont réalisé une preuve de concept sur l'intérêt de la spectroscopie d'impédance dans l'étude de l'effet de la radiothérapie sur un sphéroïde. En effet, la résistance du sphéroïde diminue avec l'augmentation de la radiation (Thielecke et al. 2004). Il s'agit aussi d'une technique intéressante pour tester l'effet de médicaments anticancéreux (Kloß et al. 2008; Bürgel et al. 2016). Avec une immobilisation de sphéroïde dans de l'hydrogel et des électrodes verticales, la spectroscopie d'impédance permet d'obtenir des informations précises telles que la façon d'agir de certains anticancéreux en fonction du nombre de cellules de la masse tumorale ou d'avoir des informations en 3D comme la façon de migrer des cellules, par le biais de marqueurs de prolifération ou de nécrose (Pan et al. 2019; S. M. Lee et al. 2016; Canali et al. 2015). Un exemple d'un dispositif d'immobilisation de cellules dans un hydrogel est donné dans la Figure 9 b) Elle permet aussi, grâce à la fabrication de microcavités dont les côtés possèdent des électrodes de réaliser des mesures différentes en fonction de la région du sphéroïde mesuré (Zitzmann et al. 2022).

Cependant cette technique reste limitée en fréquence, rendant difficile l'étude à l'intérieur des tissus cellulaires notamment, qui demandent de monter dans la gamme des GHz pour traverser les tissus et les membranes cellulaires.

6.3.2 Gamme des GHz – Mesure de paramètres S

Dans la gamme des GHz, les ondes électromagnétiques peuvent traverser les membranes et donc permettre d'étudier le milieu intracellulaire. Dans le même temps, les ondes électromagnétiques appliquées sont à des puissances suffisamment basses pour être non-invasives et non-destructives. Les mesures réalisées sont alors des mesures de paramètres S grâce à un Analyseur de Réseau Vectoriel (VNA). Ils représentent des rapports entre les signaux injectés par le VNA et transmis ou réfléchis par le composant sous test comme le montre la Figure 10. Ainsi, en fonction de l'échantillon dans le composant sous test, les paramètres S changent, permettant un suivi sans traitement préalable des échantillons biologiques contrairement à la plupart des études biologiques présentées précédemment. Les deux designs d'expérience les plus couramment utilisés pour caractériser les tissus biologiques sur ces gammes de fréquence sont les sondes coaxiales, directement en contacts avec des tissus biologiques extraient de patients et les lignes de transmissions.

Une sonde coaxiale à extrémité ouverte est couramment utilisée pour mesurer la réflexion des ondes électromagnétique (S_{11}) à travers un matériel biologique dans la gamme de fréquences de 0,1 à 10 GHz (et parfois même pour des mesures allant jusqu'à 110 GHz). Comme la ligne de transmission coaxiale finit en circuit ouvert à la frontière avec l'échantillon, son champ pénètre dans le matériau biologique liquide ou solide, ce qui affecte la réflexion des ondes EM (Keysight Technologies 2022). La méthode de conversion de la réflexion en permittivité est bien établie, et nécessite une préparation minimale de l'échantillon et est donc facile à utiliser (Aydinalp et al. 2022). Cette méthode permet notamment de réaliser des études sur des tissus complets tels que des cancers du sein, des tissus malins ou du rein (Lorenzo et al. 2013; Lazebnik et al. 2007; O'Rourke et al. 2007).

Pour ce qui est des différents types de lignes de transmission, plusieurs types existent dont les guides d'ondes coplanaires (CPW), les lignes microrubant (ML), les guides d'ondes intégrés au substrat (SIW) et les lignes de Goubeau planes (PGL) pour les fréquences plus élevées (THz). Le principe de fonctionnement de ces lignes est basé sur les changements de leurs caractéristiques dus à la modification de la constante diélectrique effective lorsqu'un échantillon est placé sur elles. Bien que toutes les structures mentionnées aient des applications en spectroscopie diélectrique, la plus utilisée en application biologique reste la configuration CPW, c'est pourquoi nous ne détaillons que cette méthode (Artis et al. 2015).

Les lignes de transmission CPW sont utilisées pour la caractérisation dans la gamme de fréquences GHz. Elles sont composées d'une ligne de signal bordée par deux plans de masse semi-infinis sur un matériau diélectrique. Le rapport entre la largeur de la ligne de signal et l'espace entre la ligne de signal et le plan de masse sont les paramètres essentiels pour contrôler l'impédance caractéristique. La propagation du champ électrique sera affectée par toute matière biologique placée sur les lignes de transmission. La permittivité effective des lignes CPW est une combinaison mathématiquement complexe de la permittivité du diélectrique et de la permittivité du matériau situé au-dessus des lignes. Dans la plupart des dispositifs, un canal micro-fluidique est construit au-dessus des lignes CPW (principalement sur la ligne de signal et les coupures capacitives où le champ électromagnétique est le plus important) pour permettre au champ électrique de pénétrer et d'être affecté par la matière biologique qui est envoyée dans le canal ; quelques exemples sont représentés dans la Figure 11 (Artis et al. 2015; Grenier et al. 2013). Les avantages des CPW sont la facilité de production, les faibles pertes, la faible dispersion et la large bande passante. Comme les CPW fonctionnent

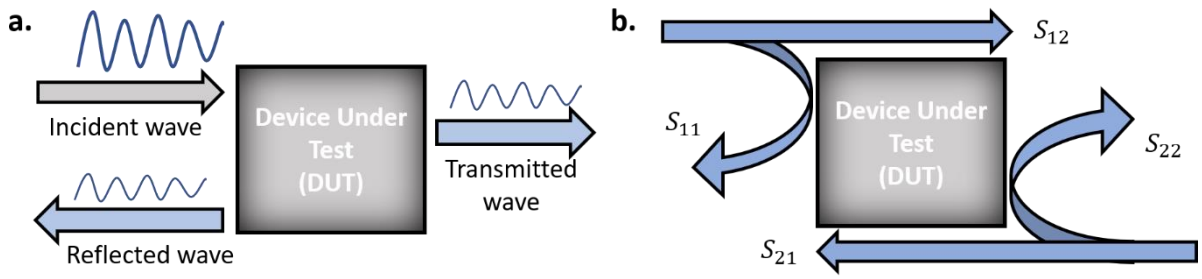


Figure 10 : (a) Principe de transmission et de réflexion des ondes hyperfréquences. (b) Traduction en termes de paramètres S.

dans la gamme de fréquences GHz, où le champ électrique peut sonder l'intérieur des cellules grâce à la suppression de l'effet capacitif de la membrane cellulaire, elles sont largement utilisées pour étudier les composants intracellulaires de nombreuses lignées cellulaires et leur réaction aux traitements chimiques et physiques (Zedek, Dubuc, et Grenier 2017; A. Tamra et al. 2019; Poiroux et al. 2020; Du et al. 2021; Amar Tamra et al. 2022; Russel et al. 2018; J. C. Chien et al. 2018; Bao et al. 2018). La Figure 11 montre la grande variété d'échelles biologiques sondables avec ce type de dispositif. Cependant, une échelle n'est pas du tout représentée dans la littérature : celle des micro-tissus, aussi appelé sphéroïdes (O'Rourke et al. 2007; Dubuc et al. 2017; T. Chen et al. 2013; Artis et al. 2014).

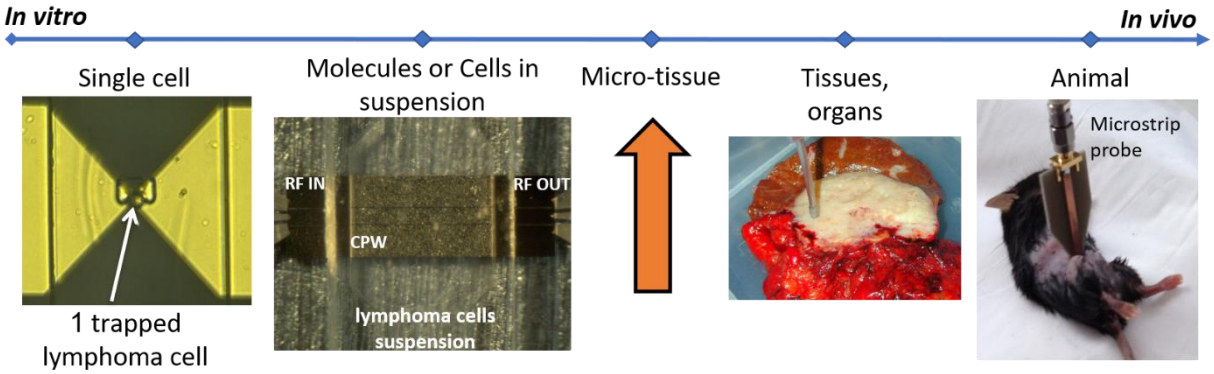


Figure 11 : Exemples de capteurs basés sur la transmission et la réflexion des micro-ondes en fonction de l'échelle du bio-échantillon pour la caractérisation diélectrique. L'échelle du micro-tissue n'étant pas encore existante dans la littérature. Photos de la gauche vers la droite, reproduites à partir de Chen et al., 2013 ; Grenier et al., 2013 ; O'Rourke et al., 2007 et de Morfoisse et al., 2018.

7 CONCLUSIONS – POSITIONNEMENT DES TRAVAUX DE THESE

Nous avons vu au cours de ce chapitre que le modèle du sphéroïde est un modèle du cancer particulièrement intéressant parce qu'il s'agit d'une culture cellulaire en trois dimensions. L'intérêt est multiple, d'abord les cellules sont en contact les unes avec les autres, de façon à ce qu'elles produisent leur propre matrice extracellulaire. Cette matrice est très importante parce qu'elle créé des couches au sein du sphéroïde en fonction de la distance au centre de la sphère, nivelage qui est déterminant dans la mise en place des différents gradients présents dans une tumeur. Un gradient d'oxygène est présent puisque, plus les cellules sont proches du centre, plus la structure est dense et plus l'oxygène a du mal à s'y infiltrer. Un gradient de nutriment existe exactement dans le même sens et pour les mêmes raisons que celui d'oxygène. Enfin un gradient de déchets métaboliques existe puisque plus la structure est dense, plus il est difficile pour les cellules de les éliminer. Ainsi à partir d'un diamètre de 200 µm un cœur de cellules nécrotiques se forme et les cellules du dessus concentriquement se différentient petit à petit jusqu'à atteindre l'angiogenèse où les cellules les plus à l'extérieur de la structure peuvent devenir invasives. Toutes ces caractéristiques sont quasiment les mêmes dans une tumeur *in vivo*, la principale différence étant que l'environnement des cellules dans un être vivant n'est pas aussi libre que dans une boite de culture. C'est pourquoi certains travaillent à l'utilisation d'hydrogel notamment pour contrôler les propriétés mécaniques autour du sphéroïde afin de comprendre le rôle de chacun de ces paramètres (Song, Park, et Gerecht 2014; Marhuenda et al. 2021). En dehors de cette limite, les sphéroïdes offrent d'innombrables possibilités notamment pour l'étude d'effet de médicaments anti-cancéreux puisque les résultats obtenus avec ce modèle sont beaucoup plus proches de la réalité *in vivo* que les modèles animaux notamment. Aujourd'hui il n'est plus possible d'ignorer les souffrances subies par les animaux utilisés pendant ce genre de tests. Ce type de modèle peut devenir une solution de remplacement à long terme.

Il a ensuite été discuté les différentes méthodes actuellement utilisées par les biologistes pour caractériser les sphéroïdes. Les plus utilisées aujourd'hui restent les caractérisations par observations optiques même si elles sont invasives, destructives et nécessitent pour la plupart des marquages préalables comme par exemple avec des anticorps fluorescents. Dans cet optique, les techniques de caractérisation électrique sont très prometteuses. En effet, la spectroscopie diélectrique n'a pas besoin de marquage préalable des échantillons. De plus, les signaux électriques utilisés ont une puissance suffisamment basse pour ne pas endommager les tissus, ce qui en fait une méthode non-invasive, non destructive et sans contact (puisque ce sont des ondes qui traversent le vivant et non directement un quelconque capteur). Les fréquences jusqu'au MHz sont intéressantes pour l'étude des interactions entre la membrane cellulaire et les milieux extérieurs. Pour sonder l'intérieur des cellules, il est nécessaire de monter dans la gamme des GHz. Il a notamment été montré que dans cette gamme de fréquence il est possible de discriminer des cellules uniques, des cellules en suspension ou même des tissus sains des mêmes types d'échantillons cancéreux, montrant par la même que cette technique peut être miniaturisée selon les

besoins de l'échantillon. Seulement nous avons vu que dans la littérature, dans la gamme des GHz, une échelle de modèles biologiques manque : celle des sphéroïdes.

Ainsi nous nous proposons de développer un nouveau dispositif permettant d'étudier les sphéroïdes par spectroscopie diélectrique microondes à partir d'une structure de type CPW comportant une coupure capacitive comme capteur. La suite de ce travail est donc dédiée à réaliser d'une part les premières caractérisations diélectriques de sphéroïdes sur la gamme de fréquence partant de 500MHz jusqu'à 20GHz. D'autre part, nous tacherons de démontrer les possibilités d'une nouvelle technique de détection sur sphéroïde non invasive et non destructive, notamment en montrant sa capacité à discriminer des sphéroïdes dont la seule différence sera le traitement chimique qu'ils auront subi. Le traitement chimique sera réalisé en amont de la mesure RF puis *in situ* au dispositif afin de réaliser une évaluation en cinétique de l'effet du traitement chimique en temps-réel.

Le prochain chapitre traitera du début de ces travaux par la mise en place d'un banc de test, de la modélisation associée à la l'estimation des paramètres S et les modifications d'un dispositif ayant été développé par une précédente doctorante dans l'équipe afin de répondre aux objectifs décrits précédemment.

Chapitre 2

Chapitre 2 : Premier micro-dispositif de spectroscopie diélectrique RF pour l'analyse de sphéroïdes

Table des matières

1 INTRODUCTION 54

2 LE DISPOSITIF INITIALEMENT ETUDIE 55

2.1 Architecture 55

2.2 Micro-fabrication du dispositif 57

3 DEVELOPPEMENT DE LA MODELISATION ELECTRIQUE 59

4 VALIDATION EXPERIMENTALE 62

4.1 Protocole Expérimental 62
4.1.1 Mesures HyperFréquence 62
4.1.2 Fabrication des sphéroïdes 63

4.2 Résultats Expérimentaux 64

4.3 Limitations du dispositif 66
4.3.1 Le positionnement de l'objet étudié dans le dispositif 66
4.3.2 L'évaporation & la dérive 69

5 CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES 71

1 INTRODUCTION

Ce chapitre présente mes travaux réalisés initialement sur un prototype de capteur micro-onde adapté pour analyser des sphéroïdes de diamètre inférieur ou égal à 300 µm. Ce capteur avait été préalablement conçu et fabriqué par une doctorante antérieure à ma thèse, à savoir A. Zedek (Zedek 2016). Suite à des premières caractérisations, j'ai été rapidement amenée à simplifier ce capteur au niveau technologique. J'ai ensuite particulièrement travaillé sur la modélisation et la caractérisation de ce dispositif afin d'en évaluer ses capacités d'analyse.

Ainsi, une description détaillée du dispositif sera réalisée, suivi de la description de sa micro-fabrication associée, avant d'arriver à la modélisation électrique développée afin d'en analyser les données. Enfin, une caractérisation hyperfréquence sur des billes de polystyrènes et des sphéroïdes fixés a été réalisée, montrant les limites de ce dispositif sur lesquelles nous conclurons ce chapitre.

2 LE DISPOSITIF INITIALEMENT ETUDIE

2.1 ARCHITECTURE

La Figure 1 présente le biocapteur initialement développé. Le biocapteur alors utilisé comportait deux parties distinctes :

- Une partie détection par spectroscopie diélectrique avec un circuit hyperfréquence constitué d'un guide d'onde coplanaire en or, d'une coupure capacitive au milieu de la structure, sur le conducteur central (voir Figure 1 b) et c)) et de ponts à air permettant d'équilibrer les masses. Ces derniers sont isolés de la couche d'or par une couche de passivation (en résine SU8 de 5 µm) qui recouvre toute la zone du capteur (dont la coupure capacitive) hormis les accès pour les pointes sur les extrémités droites et gauche du dispositif.
- Une partie fluidique, qui inclut un canal fluidique (canal et microréservoirs), une zone de placement du sphéroïde au centre du canal (comportant une couronne de placement), et deux réservoirs latéraux. La géométrie de ce canal permet de contenir 30 µL de milieu hôte (voir Figure 1 a), b) et c)). Cette configuration est ouverte, c'est à dire sans capot sur le canal et les réservoirs.

Dès les premiers tests des éléments semblaient créer de la complexité dans la structure alors qu'il fallait chercher à maitriser la mesure avant tout. Tout d'abord, le signal obtenu avec ce dispositif était particulièrement faible, la cause pouvait être la couche de passivation de SU8 de 5 µm d'épaisseur présente aussi sur la coupure capacitive comme précisé précédemment. Cependant cette couche de SU8 permettait la micro-fabrication des ponts à air. Tester d'enlever la passivation demandait par conséquent : soit un nouveau design de cette couche pour permettre la fabrication des ponts à air mais qu'elle ne soit pas présente sur la coupure capacitive ; soit de l'enlever complètement et d'enlever les ponts à air de façon momentanée jusqu'à ce que la micro-fabrication soit suffisamment maîtrisée pour savoir comment redessiner cette couche. Ainsi il nous a semblé plus judicieux de choisir la deuxième option dans un premier temps.

De plus, la structure de placement en résine proposée alors (sous forme de couronne centrée au-dessus de la zone de détection), s'est révélée réduire la taille maximale de l'objet biologique pouvant être étudié, notamment lorsque l'objet est une bille de polystyrène, donc non déformable. De plus, son étape de fabrication demandait la maitrise d'autres résines que celle utilisée pour le reste du process de fabrication (les résines Dry Film, appelées ensuite DF). Il a donc été décidé d'enlever cette étape aussi de la micro-fabrication.

En conclusion, au cours de la présente thèse un choix a été fait de simplifier la micro-fabrication ainsi que le positionnement de n'importe quel objet biologique d'un diamètre de 300 µm maximum : la couronne de positionnement a été supprimée ainsi que la passivation SU8 avec les ponts à air qu'elle permettait de fabriquer comme on le voit sur la Figure 1 d), e) et f) comparativement à la Figure 1 a), b) et c).

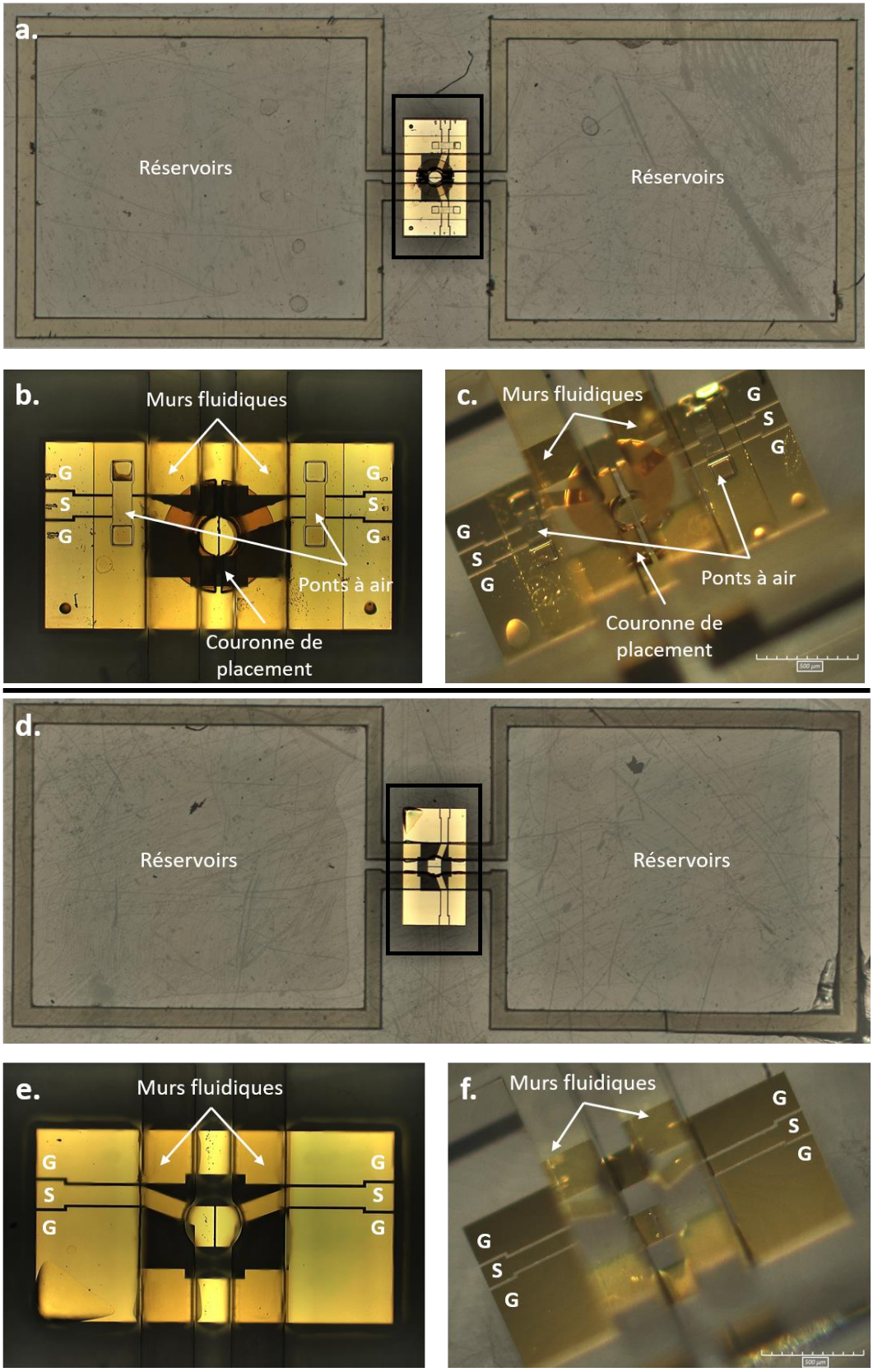


Figure 1 : Photos prises avec le microscope HIROX permettant la comparaison entre le premier dispositif réalisé par l'ancienne doctorante et celui fabriqué par la suite. a) et d) Photo globale du dispositif avec le rectangle noir montrant la zone prise pour les deux autres photos. b) et e) Photos de la partie spécifique du capteur. c) et f) Photo avec un angle de 45° afin de mieux visualiser la différence entre les deux dispositifs : la deuxième structure ne comporte plus ni de point à air, ni de passivation, ni de cercle en DF de placement du sphéroïde.

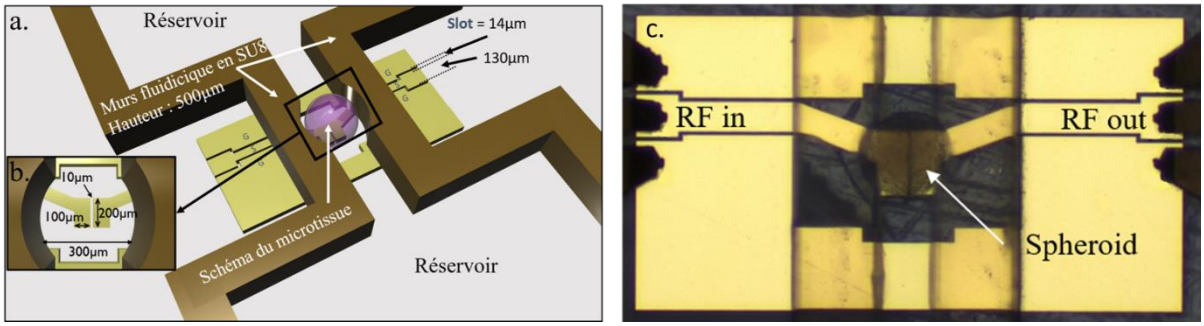


Figure 2 : Dispositif dit fluidiquement ouvert. a) Schéma détaillé du dispositif avec ces côtes principales avec en b) un zoom sur la zone du capteur. c) Photographie du dispositif avec un sphéroïde positionné dans la zone de mesure.

De cette façon la micro-fabrication du dispositif devenait beaucoup plus simple afin d'apprendre à contrôler les mesures RF et la micro-fabrication en salle blanche grâce à un dispositif simplifié.

Le dispositif utilisé au cours de ce Chapitre comporte donc des accès RF réalisés avec un guide d'onde coplanaire présentant une largeur de conducteur central de 130 µm, séparé des masses latérales par un espace de 14 µm (cf Figure 2 a). Cette configuration coplanaire permet d'utiliser des pointes de mesure radiofréquence (RF) pour la caractérisation. La taille des guides d'ondes coplanaires a été définie pour obtenir une impédance caractéristique de 50 Ω. Le biocapteur est composé d'une coupure capacitive de 10 µm de large au centre de la structure et du conducteur central, visible sur la Figure 2 b). Le sphéroïde est positionné au-dessus de cette ouverture capacitive grâce à un système fluidique d'une hauteur de 500 µm et placé perpendiculairement au guide d'onde RF. Les murs fluidiques se terminent par des réservoirs permettant de maintenir le sphéroïde fixé dans 30µL de son milieu hôte, typiquement du milieu de culture, afin d'assurer son maintien en vie avec l'accès à des nutriments et une condition osmotique cellulaire.

2.2 MICRO-FABRICATION DU DISPOSITIF

La fabrication du biocapteur est composée de deux étapes principales basées sur des procédés classiques de micro fabrication.

Le capteur électromagnétique est fabriqué sur une plaquette de quartz (Corning Eagle XG series) préalablement nettoyée par deux minutes dans un mélange piranha (50/50v d'acide sulfurique H_2SO_4 de peroxyde d'hydrogène H_2O_2) suivi d'un plasma oxygène de quinze minutes. La métallisation est réalisée en utilisant la technique lift-off. En effet, une première photolithographie de résine négative NLOF de 2.5 µm d'épaisseur est réalisée pour définir la structure du biocapteur, puis une métallisation par évaporation de Titane (Ti)/Or (Au) est réalisée grâce à la machine EVA 600. Après la métallisation un lift off dans l'acétone d'une heure environ permet d'enlever l'or adhéré à la résine NLOF et d'obtenir uniquement l'or formant la structure souhaitée. Le guide d'onde obtenu est composé d'une fine épaisseur de Ti, aidant l'adhésion d'un métal sur le substrat, suivi d'un dépôt d'Au d'une épaisseur de 300

nm. La deuxième et dernière étape correspondant à la création des murs fluidiques et des deux réservoirs placés de chaque côté du biocapteur grâce à une épaisseur de 500 µm de SU8-3050 déposée par gravitation puis insolée et développée (Peytral-Rieu, Dubuc, et Grenier 2022; Peytral-Rieu, Grenier, et Dubuc 2021). La méthode de gravitation consistant au dépôt manuel de 6g de résine SU8-3050 sur la plaquette, suivi d'un recuit sur plaque chauffante avec rampe de température lente jusqu'à 95°C (puis palier pendant 11h et redescente naturelle jusqu'à la température ambiante) avant de réaliser l'insolation à 365 nm d'une énergie de 3.6 J/cm², de poursuivre par le recuit post insolation (avec rampe de température jusqu'à 95°C et palier d'une heure) et de finir par le développement de 45min environ.

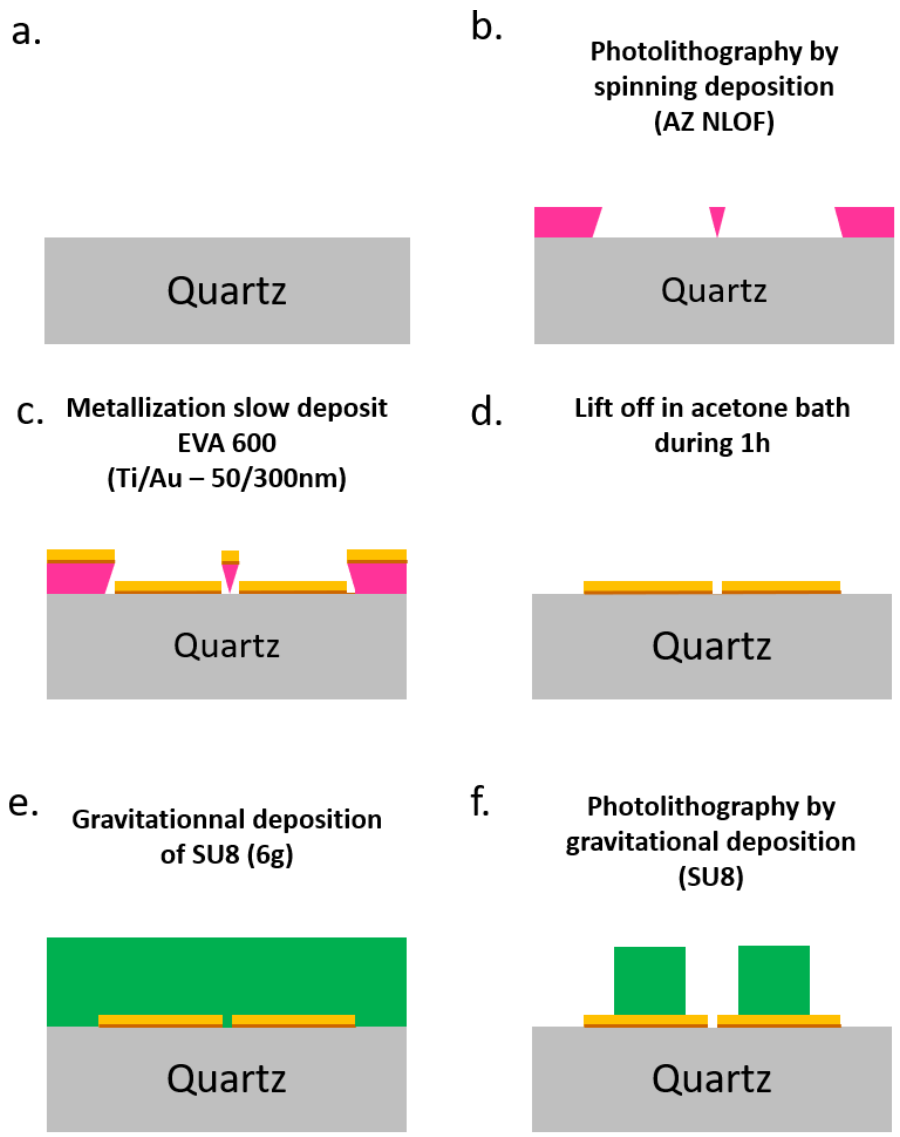


Figure 3 : Schéma de la microfabrication du bio-capteur. En rose, la représentation de la résine photosensible NLOF, en jaune, la couche conductrice en or, en marron, la couche de titane permettant l'adhésion de cette dernière au substrat en verre. Enfin, en vert l'épaisseur du polymère SU-8. a) Première étape de nettoyage de la plaquette. b) Résultat du dépôt et de l'insolation de la résine NLOF – 2.5µm. c) Dépôt lent par évaporation de la couche métallique Ti/Au (50/300nm). d) Résultats obtenus après un lift off d'une heure environ dans un bain d'acétone. e) Dépôt par gravitation d'une épaisse couche de SU8. f) Murs fluidiques obtenus après insolation et développement de la SU8.

3 DEVELOPPEMENT DE LA MODELISATION ELECTRIQUE

Le dispositif développé dans ce travail de thèse est modélisé par un système à deux accès (ports). Nous avons défini le modèle électrique de la Figure 4 a). Y_1 est l'admittance des murs fluidiques, Y_2 l'admittance de l'objet biologique mesuré, modélisé par une capacitance C et une conductance G.

La Figure 4 a) permet, grâce aux théories classiques d'électroniques hyperfréquences (Pozar 2012), d'obtenir une expression de la matrice S dans ce type de configuration en fonction des admittances normalisées $y_x = Y_x Z_0$ où Z_0 est l'impédance de référence (ici $Z_0 = 50\ \Omega$).

$$S_{11} = \frac{1-2y_1y_2-{y_1}^2}{2y_1+2y_2+1+2y_1y_2+{y_1}^2} \quad (1)$$

$$S_{21} = \frac{2y_2}{2y_1+2y_2+1+2y_1y_2+{y_1}^2} \quad (2)$$

Après factorisation du dénominateur nous obtenons ces deux équations :

$$S_{11} = \frac{1-2y_1y_2-{y_1}^2}{(1+y_1)(1+y_1+2y_2)} \quad (3)$$

$$S_{21} = \frac{2y_2}{(1+y_1)(1+y_1+2y_2)} \quad (4)$$

En calculant (3) + (4):

$$y_1 = \frac{1-(S_{11}+S_{21})}{1+(S_{11}+S_{21})} \quad (5)$$

De la même façon en réalisant le calcul (3) - (4) :

$$y_1 + 2y_2 = \frac{1-(S_{11}-S_{21})}{1+(S_{11}-S_{21})} \quad (6)$$

Ce qui nous permet d'obtenir une expression de y_2 en fonction des paramètres S :

$$y_2 = \frac{2S_{21}}{(1+S_{11})^2-{S_{21}}^2} \quad (7)$$

Tous ces calculs nous permettent ainsi d'obtenir les expressions de y_1 et y_2 en fonction uniquement des paramètres S, si on ne considère par les accès coplanaires de part et d'autre des murs fluidiques. Ainsi, en prenant en compte ces derniers, le schéma électrique équivalent devient celui de la Figure 4 b). Les paramètres S mesurés deviennent :

$$S'_{11} = S_{11}e^{-2j\theta} \quad (8)$$

$$S'_{21} = S_{21}e^{-2j\theta} \quad (9)$$

Où j est l'opérateur complexe ($j^2 = -1$) et θ la déphase électrique de chaque accès coplanaire, considérés ici sans perte (pertes négligées). Il est ainsi possible de réécrire les équations (5) et (7) sous la forme suivante :

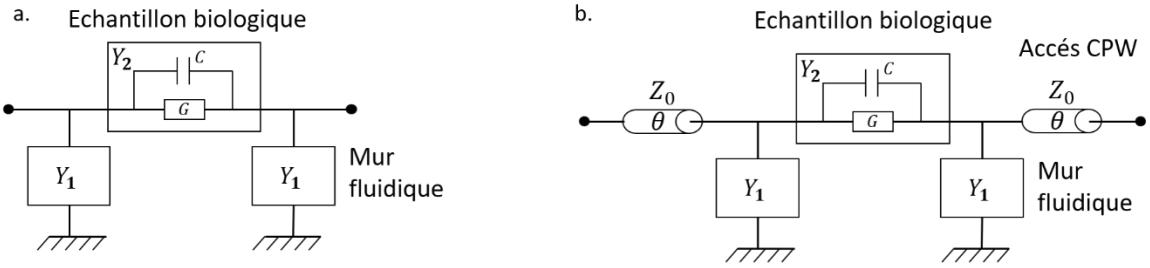


Figure 4 : Schémas électriques utilisés pour l'analyse des données, a) sans considérer les lignes d'accès, b) en les considérant.

(10) $$y_1 = \frac{1-(S'_{11}+S'_{21})e^{2j\theta}}{1+(S'_{11}+S'_{21})e^{2j\theta}}$$

(11) $$y_2 = \frac{2S'_{21}e^{2j\theta}}{(1+S'_{11}e^{2j\theta})^2 - S'^{\,2}_{21}e^{4j\theta}}$$

Les relations (10) et (11) permettent ainsi de déduire les admittances complexes Y_1 et Y_2 du schéma équivalent décrit à la Figure 4 a) à partir des paramètres S mesurés du dispositif et connaissant θ. La détermination de ce paramètre fait l'objet d'une étude décrite ci-dessous tandis que l'exploitation de la détermination de Y_1 et Y_2 permettant de décrire électriquement l'objet biologique sous investigation clôture ce paragraphe.

En posant l'hypothèse que lors de la mesure du dispositif à vide (mesure faite en tout début des expérimentations), y_2 tend vers zéro pour S'_{11vide} et S'_{21vide}. Cette hypothèse n'est, en effet, pas aberrante dans la mesure où la zone de détection capacitive de notre dispositif se trouvant dans l'air (dans sa partie supérieure, tandis que la partie inférieure se trouvant dans le substrat de quartz) dans cette situation, la valeur de la capacitance est par conséquent très faible ($C\omega \ll 50\ \Omega$), et la conductance est nulle. Dans ce cas il est possible de montrer à partir de (7) et (8) que :

(12) $$e^{2j\theta} = \frac{1-y_1}{S'_{11vide}(1+y_1)}$$

En considérant de plus que $y_1 \ll 1$ (toujours dans le cas d'une mesure à vide du dispositif, où il n'y a que de l'air dans ce dernier), il est possible d'écrire une expression simplifiée de $e^{2j\theta}$.

(13) $$e^{2j\theta} = \frac{1}{S'_{11vide}}$$

Ces hypothèses ont été expérimentalement vérifiées et nous permettent une détermination simple de θ à partir de la mesure du dispositif à vide (canal non rempli).

Le déphasage électrique des accès coplanaires étant considéré constant entre la disposition où le canal est rempli d'air (i.e. canal vide) et la situation d'une mesure de liquide, il est possible de réinjecter la relation (13) dans les équations (10) et (11). Une expression de y_1 et y_2 est alors obtenue grâce uniquement aux paramètres S' mesurés :

(14) $$y_1 = \frac{1-\frac{s'_{11}+s'_{21}}{s'_{11vide}}}{1+\frac{s'_{11}+s'_{21}}{s'_{11vide}}}$$

(15) $$y_2 = \frac{1}{2}\left(\frac{1-\frac{s'_{21}-s'_{11}}{s'_{11vide}}}{1+\frac{s'_{21}-s'_{11}}{s'_{11vide}}} - y_1\right)$$

Le code Matlab qui permet de trier les fichiers de paramètres S venant directement du VNA utilise les deux équations (14) et (15) pour, *in fine*, extraire la valeur de la capacitance C et de la conductance G de notre objet biologique étudié, en exploitant les relations (16) et (17).

(16) $$C = \frac{1}{2\pi f}\frac{Img(y_2)}{50}$$

(17) $$G = \frac{Re(y_2)}{50}$$

Enfin, les variations des paramètres électriques C et G que l'on souhaite exploiter pour nos analyses biologiques sont faibles (les variations de C et G sont généralement inférieurs à 5%) : c'est pourquoi la détermination d'un contraste est réalisée. Pour cela, en début d'expérience, une mesure du milieu hôte, utilisée comme référence, est d'abord faite avant de réaliser la mesure avec le liquide hôte et l'objet biologique d'étude. Il est alors possible d'écrire comme suit :

(18) $$\Delta C = C_{DUT} - C_{ref}$$

(19) $$\Delta G = G_{DUT} - G_{ref}$$

Où C_{DUT}, et G_{DUT} sont la capacitance et la conductance du dispositif avec l'objet biologique étudié dans son liquide hôte de référence (DUT = Device Under Test), et C_{ref} et G_{ref} correspondant à la capacitance et la conductance du dispositif ayant uniquement le liquide de référence (le Phosphate Buffer Saline, PBS dans ce chapitre).

Chaque mesure avec l'objet biologique est réalisée pendant 25 min pour observer et quantifier la potentielle dérive liée à l'architecture du système fluidique ouvert (et fermé au Chapitre 3). La moyenne et les écart types des mesures faites sur 25 min sont donc calculés et représentés à la Figure 7 et dans la Figure 10 a).

4 VALIDATION EXPERIMENTALE

4.1 PROTOCOLE EXPERIMENTAL

4.1.1 Mesures HyperFréquence

La caractérisation des composants hyperfréquences exige une calibration préalable de l'analyseur vectoriel de réseau vectoriel deux ports. Ce calibrage, de type SOLT (Short, Open, Load, Thru) est réalisé avec un kit de calibration Cascade Microtech. Le principe de cette calibration est de mesurer les paramètres S de charges connues permettant de supprimer les erreurs induites par les pointes coplanaires et par les câbles coaxiaux reliant les pointes à l'analyseur de réseau vectoriel. Cette calibration nous permet de placer nos plans de mesures à l'interface entre pointes hyperfréquences et guides d'ondes coplanaires d'accès au dispositif.

Avant de rentrer dans le détail du protocole de mesure hyperfréquence, nous allons décrire le banc de test tel que la Figure 5 le présente. En effet, la station sous pointe, représentée à droite de la Figure 5, est positionnée sur une table anti-vibration avec à l'arrière le VNA (de façon à ce que les câbles coaxiaux RF ne soient pas contraints mécaniquement). Le positionnement des pointes ainsi que le contrôle de façon générale du micro-dispositif se fait grâce à un microscope droit dont l'image est retranscrite par une caméra sur un écran positionné sur le VNA. Un pousse seringue est installé à côté de la station sous pointe en prévision des expériences en flux permanent qui seront décrit dans le Chapitre 3 de ce manuscrit. La loupe binoculaire sur la paillasse permet de sélectionner préalablement les objets qui vont être positionnés dans le dispositif. Enfin le contrôle du VNA se fait grâce un logiciel sur l'ordinateur, à la droite de la photo de la Figure 5.

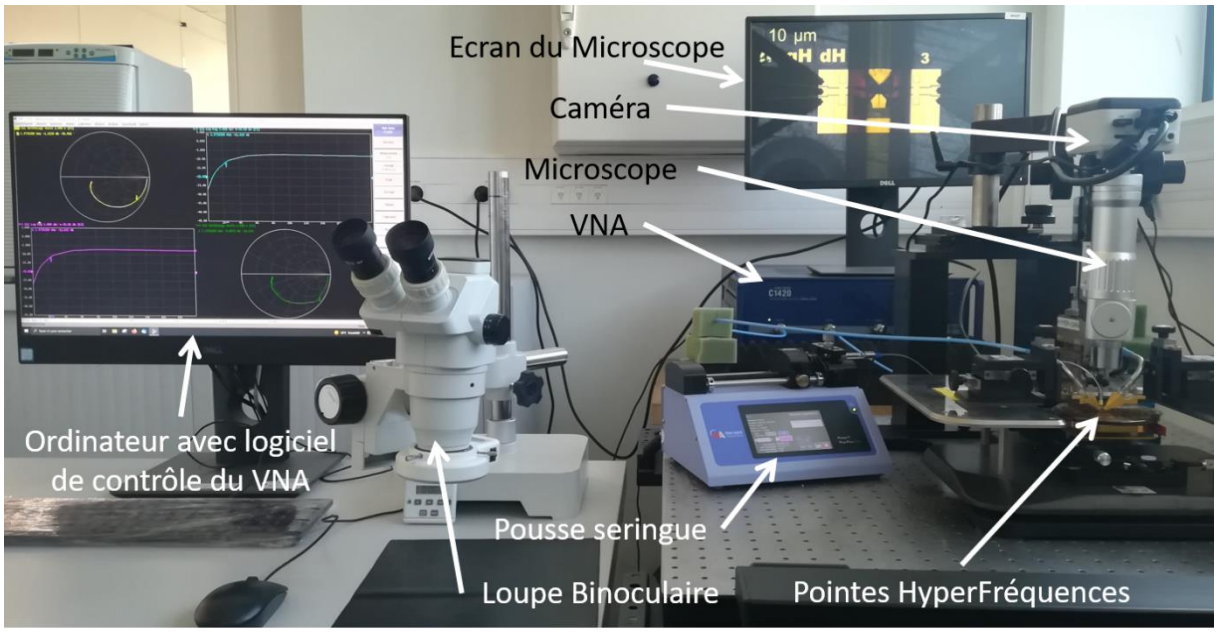


Figure 5 : Photo de présentation du banc de test hyperfréquences avec les différents éléments utilisés.

Après cette étape de calibrage, le dispositif est positionné au contact des pointes hyperfréquences et une première mesure des paramètres S est réalisée permettant d'obtenir les S'_{11vide} et S'_{21vide} nécessaires ensuite dans l'analyse des données (voir sur la Figure 2 e) la photographie du banc de mesures des paramètres S). Ensuite, le milieu hôte seul est déposé dans le dispositif et des mesures des paramètres S sont réalisées pendant 25 min afin de vérifier la stabilité de mesure du dispositif. Ce remplissage se fait en déposant 15µL du milieu hôte dans chacun des réservoirs, puis de vérifier qu'aucune bulle ne se forme sur la zone détection. Enfin l'objet étudié doit être déposé dans son milieu hôte. Juste avant de le positionner manuellement sur la zone de détection grâce à une micropipette, une mesure des paramètres S du milieu hôte est réalisée (donnant C_{ref} et G_{ref}). Une fois l'objet correctement positionné : des mesures des paramètres S sont alors réalisées pendant 20min pour en extraire ses paramètres diélectriques.

4.1.2 Fabrication des sphéroïdes

La lignée cellulaire qui a été choisie pour ce manuscrit est la lignée HepG2 provenant d'un tissu hépatique d'un patient présentant un carcinome hépatocellulaire. Ces cellules sont un modèle pertinent car elles possèdent des capacités métaboliques bien caractérisées proches des hépatocytes normaux et que les contaminants étudiés dans la suite de ce manuscrit sont tous hépatotoxiques. De plus, les cancers du foie représentent la troisième cause de mort par cancer et entre 80 à 90% de ceux-ci sont de type carcinome hépatocellulaire dont est issus la lignée HepG2 (Arzumanian, Kiseleva, et Poverennaya 2021).

La méthode que nous avons choisie pour fabriquer les sphéroïdes est l'utilisation de moules fabriqués par Sigma, appelés Micro Tissues 3D Petri Dish taille S, tableau de 16 x 16 cases, permettant d'être mis dans des plaques contenant 12 puits. Il faut couler de l'agarose 1% dans ces moules, laisser refroidir, les démouler et les mettre dans des plaques à six puits pour les immobiliser dans le fond des puits avec de l'agarose. Un équilibrage de l'agarose dans le milieu de culture est nécessaire pendant 45 min avec changement du milieu toutes les 15 min. Après cette étape, les micro-moules sont prêts à recevoir des cellules.

Les cellules adhérentes mises en culture dans des flasques sont alors passées grâce à de la trypsine pendant 5min, avant de subir une centrifugation permettant de les re-suspendre à une concentration donnée afin d'être déposées dans les micro-moules. Le tout est ainsi laissé en culture pendant trois jours pour former des sphéroïdes d'environ 300 µm de diamètre (voir sur la Figure 6 le schéma détaillé du protocole).

La récupération des sphéroïdes avec une micropipette P1000 après les trois jours de culture permet de les déposer dans un Eppendorf pour fixation ou pour réaliser une individualisation dans des plaques à 96 puits en fonction des expérimentations programmées. Dans les deux cas, les sphéroïdes sont alors mis dans du milieu de culture DMEM ne contenant pas de sérum de veau fœtal (SVF) mais contenant de la Pénicilline/Streptomycine (P/S) et 25mM d'acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique (HEPES) (permettant de tamponner le pH du milieu à température ambiante) afin que leur croissance s'arrête. Individualisés, ils peuvent être utilisés vivants pour des expérimentations pendant trois jours

maximum. La fixation des sphéroïdes est réalisée après leur récupération avec de la Formaline pure pendant 2h30 à température ambiante ou toute la nuit à 4°C.

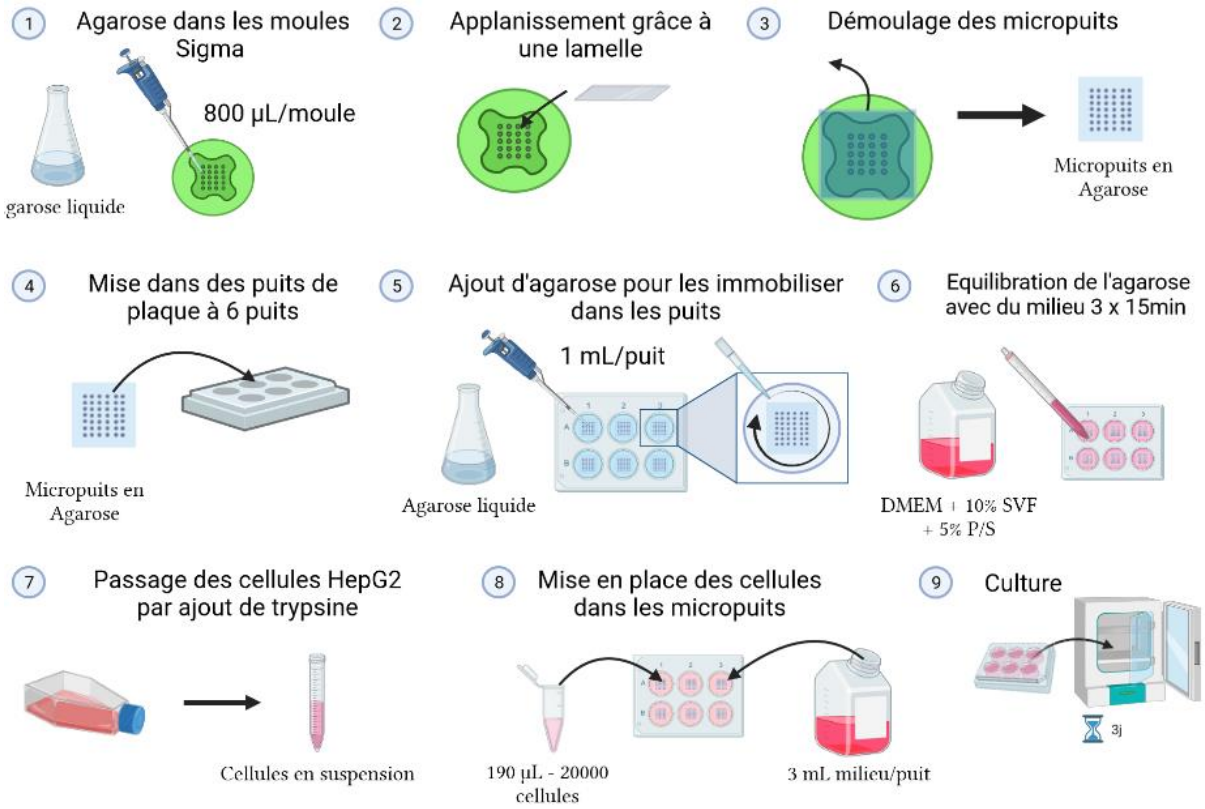


Figure 6 : Protocole expérimental de la fabrication de sphéroïdes tumoraux choisi pour ce travail de thèse

4.2 RESULTATS EXPERIMENTAUX

Pour valider le micro-dispositif et son bon fonctionnement, la mesure de deux billes de polystyrène a d'abord été réalisée, puis trois sphéroïdes fixés à la Formaline ont été mesurés toutes les minutes pendant 25min. La capacitance et la conductance en fonction de la fréquence sont représentées sur la Figure 7.a) et b) par le biais de la moyenne des valeurs sur la période de mesure pour un objet donné. En revanche, pour les contrastes capacitifs et conductifs de la Figure 7.c) et d) il s'agit de la valeur moyenne et de l'écart type sur la période de mesure qui sont représentés. En effet, les écarts types ne sont pas représentés sur les deux premières parties a) et b) de la Figure 7 pour cause de lisibilité. Enfin, les parties e) et f) de la Figure 7 montrent les représentations dans le plan complexe des objets étudiés : c'est-à-dire, la conductance en fonction de la capacitance (Figure 7 e) et le contraste conductif en fonction du contraste capacitif (Figure 7 f), pour deux fréquences données. Les fréquences choisies correspondent à celles permettant la différentiation la plus forte entre les différents objets : 5 GHz pour la capacitance et le contraste capacitif ; 20 GHz pour la conductance et le contraste conductif.

Il est possible de remarquer d'abord que la méthode de contraste permet de lisser les signatures HF et de rendre plus lisibles les différences entre les sphéroïdes notamment. Les contrastes capacitif et conductif sont plus faibles en valeur absolue pour le sphéroïde fixé que pour une bille de polystyrène.

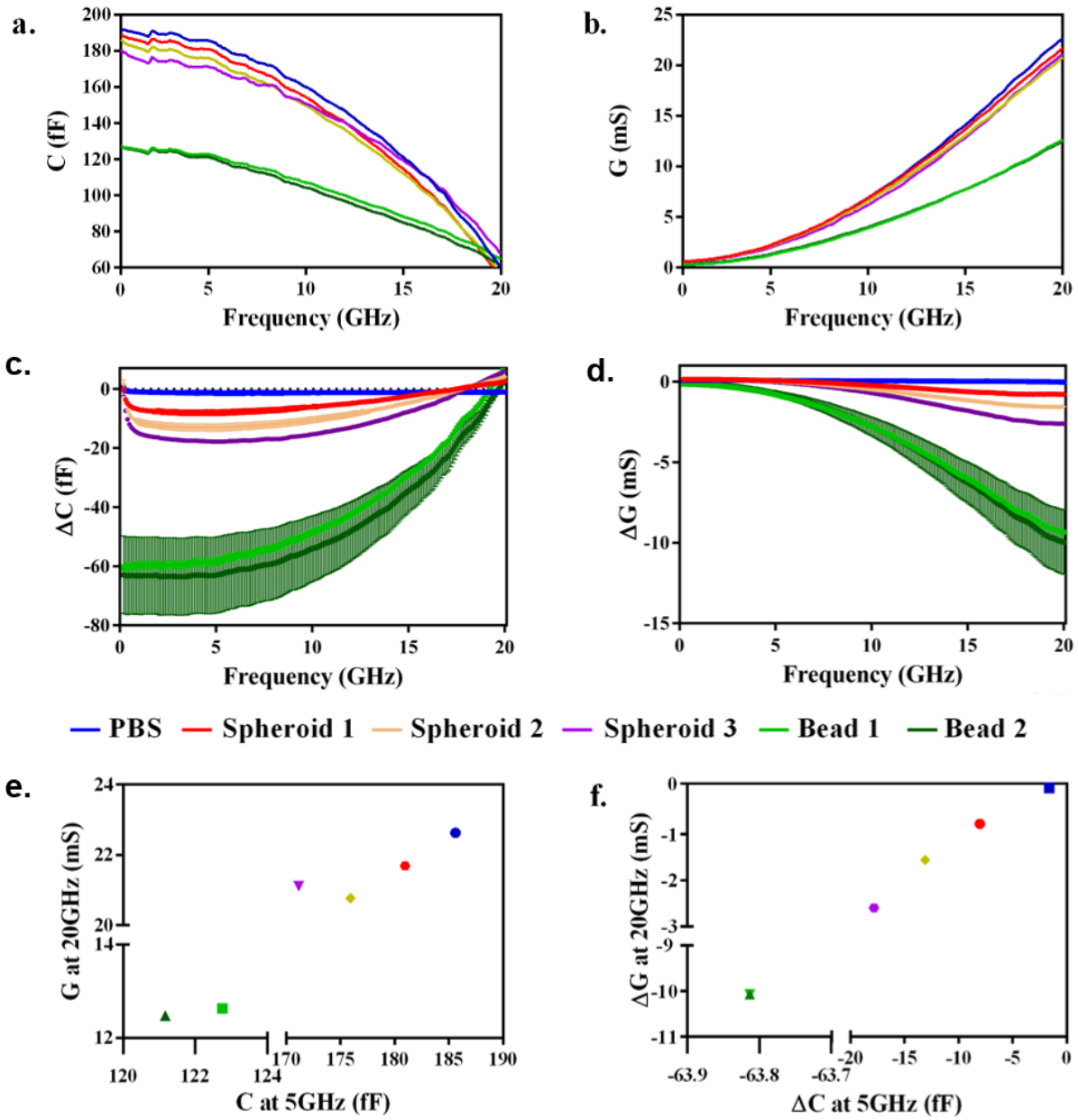


Figure 7 : Mesures moyennes sur 25 min réalisées avec différentes billes de polystyrène et des sphéroïdes. a) Capacitance et b) conductance extraites suivant la fréquence pour les différents objets sous test. Contrastes c) capacitif et d) conductif moyens et écarts types sur 25 min. e) Représentation dans le plan complexe de la capacitance et de la conductance, respectivement à 5 GHz et 20 GHz. f) Représentation dans le plan complexe du contraste capacitif et conductif pour les fréquences respectives de 5 GHz et 20 GHz. Les sphéroïdes et les billes de polystyrène testés présentent des diamètres compris entre 200 µm et 360 µm.

Ces résultats sont cohérents puisque la bille présente une permittivité proche de 3, tandis que la permittivité d'un sphéroïde est plus proche de celle du milieu hôte liquide, le PBS. Ceci est d'autant plus vrai que le sphéroïde a subi une fixation avec du formaldéhyde, traitement qui provoque la perméabilisation de la membrane cellulaire. Ainsi, quand il est stocké dans du PBS, un équilibre entre les milieux intra et extra-cellulaire se forme ce qui diminue les contrastes diélectriques (Artis et al. 2015). Dans ces conditions le contraste mesuré est donc plus faible en valeur absolue que pour un sphéroïde vivant, permettant une preuve de concept avec un objet biologique plus facilement manipulable mais plus difficile à détecter.

Enfin, chaque sphéroïde présente une réponse spécifique notamment à cause des différences de formes et de tailles. En effet, malgré une méthode qui permet la création de nombreux sphéroïdes en peu de temps, il est difficile d'obtenir que les sphéroïdes soient parfaitement ronds et avec exactement le même diamètre.

Ces premiers résultats ont été jugés très encourageants. Ils ont en effet montré la faisabilité de mesurer des sphéroïdes dans leur milieu de culture par spectroscopie diélectrique micro-onde, ce qui n'avait jamais été fait jusqu'ici. Les résultats de mesure de billes de polystyrène et de micro-tissus fixés sont cohérents et permettent de consolider l'approche suivie. Ces premières investigations nous ont également permis de mettre en lumière des limitations induites par la configuration du dispositif, à savoir un manque de localisation précise de l'échantillon et de par la fluidique non capotée de l'évaporation du liquide.

4.3 LIMITATIONS DU DISPOSITIF

4.3.1 Le positionnement de l'objet étudié dans le dispositif

Les écart types présentés dans la Figure 7.c) et d) montrent qu'il existe une bien plus grande variabilité dans les mesures de billes de polystyrène que pour les sphéroïdes. Ceci peut s'expliquer par le fait que les billes de polystyrènes ne sont pas déformables et par conséquent elles sont plus petites que le canal fluidique, ce qui peut provoquer une variabilité dans le positionnement des billes sur la zone de détection. En effet, le placement étant manuel, il est difficile à contrôler parfaitement, surtout verticalement : est-ce que la bille est située au plus proche des électrodes ou au contraire est-elle à une distance d inconnue des électrodes. Pour tenter de répondre à ces interrogations plusieurs objets ont été imaginé puis testé pour maintenir la bille de polystyrène au plus proche des électrodes. Ce travail a été réalisé avec la collaboration de J. Foncy grâce au MultiFab du LAAS-CNRS.

Tout d'abord deux dispositifs ont été imaginés : une pointe de positionnement et un capuchon. Les deux sont, respectivement, présentés dans la Figure 8 a) et b) avec les schémas en trois dimensions de chacun d'entre eux et le positionnement prévu sur le micro-dispositif.

La pointe de positionnement de la Figure 8 a) a été imaginée pour posséder une pointe de la forme et de la taille correspondant à l'alcôve prévue dans le canal fluidique pour le

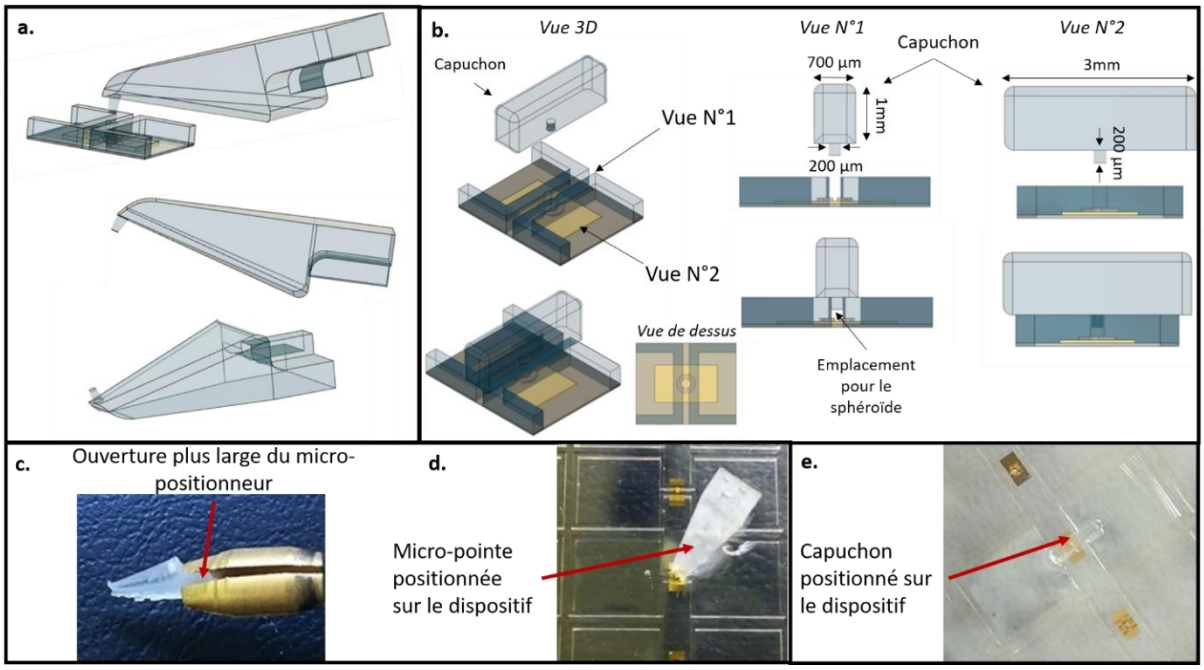


Figure 8 : Figure représentant les deux premiers objets imaginés pour contrôler le positionnement vertical de la bille de polystyrène. a) Une pointe de positionnement possédant une extrémité de la taille du canal fluidique au centre de la structure et vouée à être fixée sur des micro-positionneurs grâce à une forme en T possédant un côté plus large que l'autre. b) Un capuchon possédant une extrémité au centre de la structure de la même taille que le canal fluidique et de la longueur du canal afin de répondre au problème d'évaporation constaté. c) Test de fixation sur le micro-positionneur de la micro-pointe de positionnement et constatation que le T n'est pas dans le bon sens pour avoir l'extrémité dessous et pas sur le côté. d) Positionnement hors banc de test de la pointe de positionnement afin de vérifier les dimensions de l'extrémité : sa topologie et sa taille sera validée. e) Test hors banc de test RF du capuchon révélant son positionnement difficile même si les côtes correspondaient parfaitement.

positionnement du sphéroïde. Elle est prévue avec une structure en entonnoir permettant de déporter sa fixation sur les micro-positionneurs et de visualiser plus aisément son placement sur le banc de test RF (où le microscope utilisé est droit). La fixation a été décidée sous forme de T afin de mieux maintenir sa position et de correspondre à la forme cruciforme des micro-positionneurs, avec un côté plus large que l'autre.

Le capuchon a été imaginé pour limiter l'évaporation sur toute la longueur du canal fluidique et pour maintenir la bille de polystyrène plaquée sur les électrodes. Ainsi il possède une pointe au centre de sa structure, de la même taille et forme que pour la pointe de positionnement. En revanche il est de même longueur que le canal fluidique jusqu'au réservoir comme on peut le voir grâce aux différents angles de vues présentés dans la Figure 8 b).

Ces deux dispositifs d'optimisation du positionnement de la bille de polystyrène ont été imprimés en 3D en résine DS3000 grâce à l'imprimante DWS. Les premiers tests ont révélé que l'extrémité coïncidait parfaitement avec le centre de la structure fluidique comme on peut le voir sur les photographies de la Figure 8 c) et d). En revanche, pour la pointe de positionnement le T de fixation n'était pas dans le bon sens pour pouvoir utiliser les micro-positionneur : en effet la partie la plus large du T telle quelle nous permettait uniquement d'avoir l'extrémité sur le côté et pas vers le bas (Figure 8 c)). De plus, l'extrémité était trop verticale sous le bout de la pointe de positionnement rendant difficile son placement par

unique vue de dessus. Quant au capuchon, il s'est avéré particulièrement léger, et impossible à manipuler autrement qu'avec une pince le rendant dangereux lors d'un placement sur banc de test à cause de la fragilité des pointes RF notamment. Cette dernière option a donc été abandonnée.

Un nouveau dessin de pointe de positionnement a donc été créé afin de corriger l'angle de l'extrémité d'une part et la fixation en forme de T d'autre part : la pointe obtenue est présentée à la Figure 9 a) et b). Elle a été fabriquée aussi par imprimante 3D avec de la résine DS3000 puis testée sur banc de mesure complet, avec et sans pointes RF positionnées comme présenté sur la Figure 9 c). Le microscope droit permet un positionnement de la pointe par vue de dessus au centre de la structure (Figure 9 d). Cependant pour un contrôle vertical une autre caméra microscope possédant un angle oblique vis-à-vis du banc de test a été nécessaire et mise en place (Figure 9 e), notamment parce que le microscope droit ne permettait pas de visualiser de façon net le dispositif fluidique et la pointe de positionnement.

Dans cette configuration la pointe de positionnement est utilisable mais elle rend très inaccessible le dispositif dans lequel la bille de polystyrène doit toujours être déposée manuellement (la caméra DinoLite doit être placée après positionnement de la bille notamment). Elle est très proche des pointes HF alors qu'elles sont fragiles. Enfin, aucune amélioration n'a été notée sur les résultats HF de mesures de billes de polystyrènes. Pour toutes ces raisons, cette option a dû être abandonnée pour la suite.

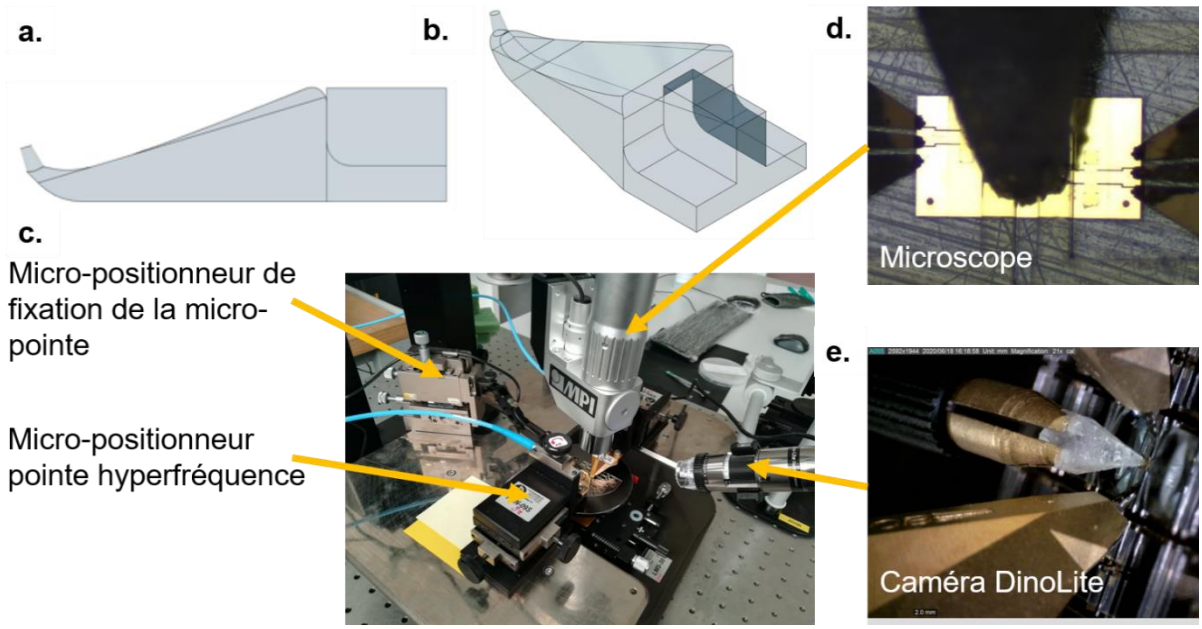


Figure 9 : Pointe de positionnement permettant de bloquer l'objet étudié sur la zone de détection et son utilisation. a) Vue en coupe de côté, b) vue 3D avec à droite ce qui permet de fixer cette pointe au micro-positionneur de fixation présent sur la partie c). d) Photographie réalisée grâce au microscope de la station sous pointe HF. e) Photo prise grâce à une caméra Dinolite positionnée de telle façon à pouvoir contrôler la hauteur de la pointe de positionnement vis-à-vis du dispositif.

4.3.2 L'évaporation & la dérive

Durant les mesures sur 25min, une certaine instabilité a été observée. La Figure 10.a) présente des mesures moyennes et leurs écarts types correspondants obtenus lorsqu'un biocapteur donné est chargé uniquement avec du PBS sur différents jours de mesures. Les ruptures de pentes correspondent à l'ajout manuel de 5µL dans le dispositif afin de contrebalancer l'évaporation assez importante malgré les microréservoirs. Cependant, même après l'ajout de 5µL, il n'y a pas de retour à la valeur initiale : une autre dérive est alors à l'œuvre. Ainsi, une tentative d'étude quantitative des deux dérives observées a été réalisée afin de voir s'il était possible de les prédire.

Pour ce faire, pour chacune des mesures de PBS durant 25 min, une hypothèse est posée, celle que les deux dérives (évaporation et dérive dite « systématique ») sont indépendantes. Ainsi elles peuvent être décorrélées par le protocole suivant :

- Chaque ajout de 5 µL dans le dispositif contrebalance entièrement l'évaporation
- Ainsi, la différence entre la valeur initiale de la série de mesure et la mesure post ajout de 5 µL correspond uniquement à la dérive dite « systématique » sur la durée considérée.

Il est alors possible de réaliser des calculs de pentes pour chacune des expérimentations avant de réaliser des moyennes globales, grâce aux équations suivantes (en fonction de la donnée expérimentale utilisée) :

$$\frac{\Delta C}{\Delta T} = \frac{\Delta C_{t2} - \Delta C_{t1}}{t_2 - t_1} \quad (20)$$

$$\frac{\Delta G}{\Delta T} = \frac{\Delta G_{t2} - \Delta G_{t1}}{t_2 - t_1} \quad (21)$$

Où t_1 et t_2 correspondent aux instants d'analyse, et ΔC et ΔG correspondent aux contrastes capacitif et conductif respectivement. Les pentes pour la dérive dû à l'évaporation sont obtenues à partir des points avant et après l'ajout de 5µL, en cohérence avec l'hypothèse proposée précédemment. Cette pente est alors considérée constante entre le précédent calcul et le suivant. La dérive dite « systématique » est déduite en soustrayant la dérive d'évaporation aux pentes obtenues sur les points précédant l'ajout de 5µL. L'analyse est réalisée pour chacune des mesures de PBS durant 25min et les résultats sont ensuite recompilés et formulés sous la forme de moyennes par période de temps équivalente. Ainsi, des pentes rendant compte des dérives d'évaporation et systématique sont obtenues pour les quatre phases chronologiques suivantes : de 2 à 6 min, de 7 à 11 min, de 12 à 17 min et de 18 à 26 min.

Les résultats sont présentés dans la Figure 10 b) et c) pour la dérive systématique et pour la dérive due à l'évaporation respectivement. La dérive systématique est quasi constante d'environ 0.03 fF/min pour le contraste capacitif à 5 GHz et de 1.4 mS/min pour le contraste conductif à 20 GHz. Quant à la dérive d'évaporation, elle est aussi quasi constante : d'environ

0.035 fF/min pour le contraste capacitif à 5 GHz et de 1.5 mS/min pour le contraste conductif à 20 GHz.

Il apparaît donc que ces dérives peuvent être considérées constantes, et leur mesure répétable. Cela valide notre hypothèse de départ quant à l'indépendance de ces deux dérives. Les dérives peuvent ainsi être prédites mais cela va tout de même entacher la précision des mesures, l'idéal étant de les annuler.

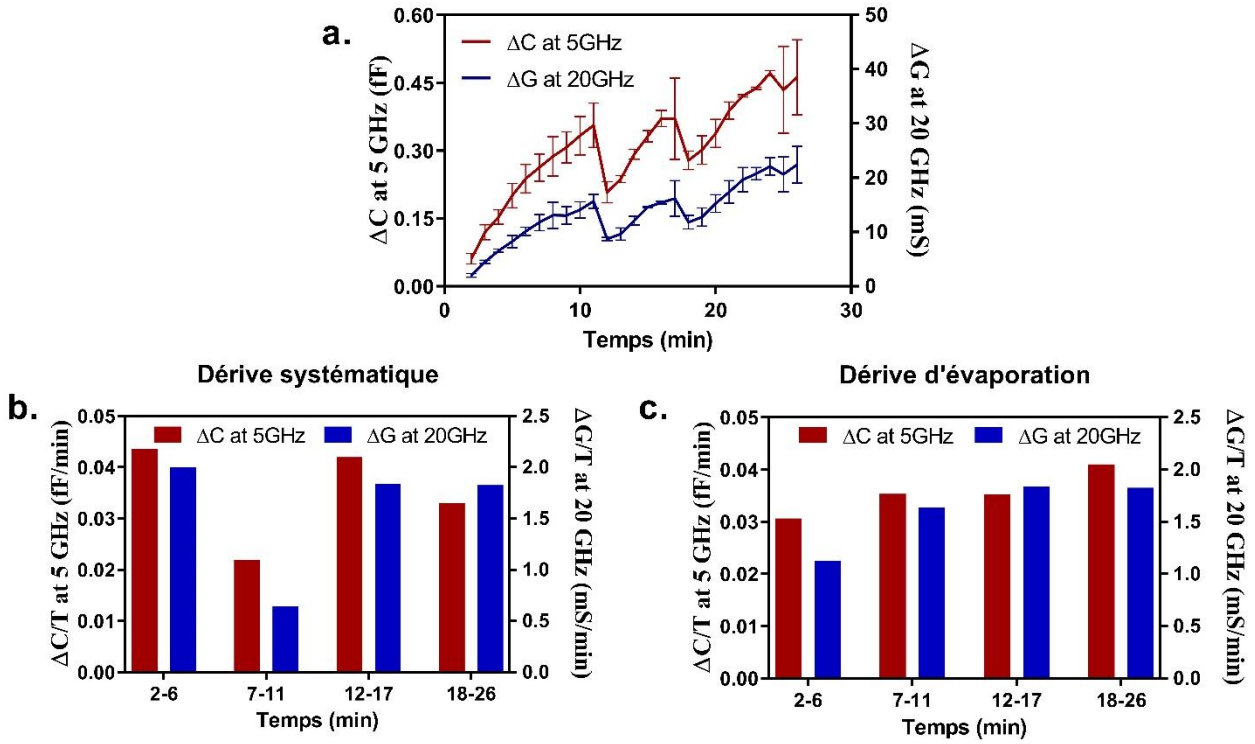


Figure 10 : Tentative de mesures quantitatives des dérives expérimentales observées. Le contraste capacitif est représenté en rouge, associé à l'axe des ordonnées de gauche, le contraste conductif est en bleu, associé à l'axe des ordonnées de droite. a) Mesures moyennes réalisées avec un dispositif donné chargé uniquement du milieu hôte (PBS) avec les écarts types associés à différents jours d'expérimentations. b) et c) Résultats obtenus des différents calculs de pente pour la dérive dû à l'évaporation et dû à la dérive systématique respectivement. En trait plein les valeurs expérimentales, en traits pointillés les courbes de tendance avec leur R^2 associé.

5 CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Dans ce chapitre, le premier dispositif permettant des caractérisations diélectriques de sphéroïdes a été développé avec son modèle électrique associé et caractérisé grâce à des billes de polystyrènes d'abord puis des sphéroïdes fixés à la formaline ensuite. Le protocole détaillé de la fabrication des sphéroïdes a été présenté et sera conservé pour le reste de ce travail de thèse.

Les résultats obtenus sont particulièrement prometteurs sur l'utilisation de la spectroscopie diélectrique microondes pour l'étude des sphéroïdes puisqu'ils permettent de distinguer les sphéroïdes entre eux malgré le fait qu'ils aient subi une fixation qui induit des contrastes diélectriques par rapport au milieu hôte très faibles mais malgré tout significativement observables.

En revanche plusieurs limites du dispositif ont été soulevées. D'abord, un problème dû au positionnement manuel de la bille (ou du sphéroïde) étudié provoquant une variabilité de la mesure HF puisqu'il est impossible de contrôler le contact entre l'objet et la zone de détection. Ainsi, pour le régler une pointe de positionnement a été imaginée permettant, fixée à un micro-positionneur de « plaquer » l'objet étudié au contact de la zone de détection. Cependant son utilisation multiplie les outils présents sur la station sous pointe, notamment proche des pointes HF rendant compliquée son utilisation et donc n'améliorant pas les mesures réalisées.

Enfin un autre défaut de la structure fluidique ouverte du dispositif a été observé et discuté. En effet, une évaporation assez importante nécessite d'ajouter du milieu hôte régulièrement sur 25min de mesure, provoquant une dérive de la mesure HF. Une autre dérive, appelée ici systématique est observée puisque malgré l'ajout de liquide, les contrastes ne reviennent pas à leurs mesures initiales. Une analyse quantitative a été proposée pour décrire ces deux dérives à partir du calcul des pentes de dérive en fonction du temps. Bien que prédictibles ces dérives imposent néanmoins une limitation de sensibilité, conséquence de cette instabilité temporelle des mesures.

La conclusion de ce chapitre est donc que le développement d'un nouveau dispositif basé sur la même structure de détection hyperfréquence est nécessaire afin de stabiliser la mesure, la rendre répétable et d'améliorer le placement de l'objet biologique étudié. La même structure de détection hyperfréquence permettra de garder la modélisation électrique présentée dans ce chapitre pour l'analyse des données.

Chapitre 3

Chapitre 3 : Micro-dispositif de spectroscopie diélectrique RF pour l'analyse des sphéroïdes : architecture fluidique avancée

Table des matières

1 INTRODUCTION 75

2 ETAT DE L'ART DES STRUCTURES DE PIEGE FLUIDIQUE 76

2.1 Avec contact 76
2.1.1 Piège vertical 76
2.1.2 Pièges latéraux 78

2.2 Sans contact 79
2.2.1 Hydrodynamique 79
2.2.1.1 Micro-fluidiques des gouttes 79
2.2.1.2 Micro-fluidique d'inertie 80
2.2.1.3 Vortex 80
2.2.2 Méthodes électriques 81
2.2.2.1 Diélectrophorèse 81
2.2.2.2 Electro-osmose 81
2.2.3 Pièges magnétiques 82
2.2.4 Pièges acoustiques 82
2.2.5 Pièges optiques 83
2.2.5.1 Les pinces optiques 83
2.2.5.2 La diélectrophorèse optique 83

2.3 Conclusions de l'état de l'art 86

3 CAS DES CAPTEURS RF A L'ECHELLE DE LA CELLULE UNIQUE 87

4 PARTIE A : OPTIMISATION FLUIDIQUE DU CAPTEUR 91

4.1 Choix de la configuration du piège fluidique pour sphéroïde, développement et première preuve de concept 91
4.1.1 Choix de la solution de piégeage de sphéroïdes 91
4.1.2 Preuve de concept par la fabrication de piège en technologie PDMS 93

4.2 Micro-fabrication du dispositif fluidique dit fermé 96

4.2.1 Description du dispositif RF fluidique avec piège mécanique 96
4.2.2 Processus de fabrication 97
4.2.3 Optimisations technologiques 99
4.2.3.1 La première métallisation 99
4.2.3.2 La deuxième métallisation 99
4.2.3.3 Les différentes étapes de film sec DF 101
4.2.3.4 Optimisation du canal fluidique 102

4.3 Comparaison du dispositif ouvert/fermé 104

5 PARTIE B : OPTIMISATION DE LA SENSIBILITE DU MICRO-DISPOSITIF RF 107

5.1 Influence de la largeur du gap capacitif sur la mesure hyperfréquence 107
5.1.1 Choix de l'objet modèle et du milieu hôte pour cette étude 107
5.1.2 Simulations électromagnétiques 107
5.1.3 Vérification Expérimentale 110

5.2 Validation sur un cas d'étude 111

6 CONCLUSIONS 114

1 INTRODUCTION

Ce chapitre est dédié au développement d'un nouveau dispositif fluidique fermé de façon à supprimer l'évaporation observée précédemment. L'autre problématique dont l'importance a été prouvée au chapitre précédent est l'imprécision du positionnement de l'objet biologique vis-à-vis des électrodes, et en particulier de l'espace entre les deux électrodes qui forment la capacité de détection. Pour ce faire le développement d'un piège fluidique permettant de contrôler parfaitement sa position est nécessaire. Cependant de très nombreux pièges fluidiques existent déjà dans la littérature, c'est pourquoi un état de l'art sera tout d'abord réalisé. Il permettra de classer les différentes méthodes en fonction de leur fonctionnement avec leurs avantages et leurs inconvénients respectifs. La principale application biologique sera la cancérologie puisqu'il s'agit de celle des sphéroïdes.

Après avoir listé toutes les méthodes existantes de pièges fluidiques appliqués aux sphéroïdes, une synthèse de celles utilisées à l'échelle de la cellule unique dans le cadre de caractérisation électrique des tissus biologiques sera réalisée. En effet, pour le moment, en analyse électrique sur sphéroïde : rien n'existe. Par conséquent, nous avons dû nous inspirer de ce qui a été fait à une bien plus petite échelle qu'est la cellule unique.

Ensuite, la solution que nous avons imaginé et développé sera présentée : d'abord le concept et son origine, puis les premières preuves de concept réalisées avec des matériaux bon marché, pour arriver ensuite à sa filière technologique de micro-fabrication et les améliorations qui ont été réalisées pour obtenir une structure fluidique optimisée. Cette structure fluidique optimisée a ensuite été comparée avec la structure fluidique ouverte du Chapitre 2 avec comme objet d'étude des billes de polystyrènes (objet avec lequel la plus grande variabilité des données avait été observée). Une étude quantitative de l'amélioration de stabilité des mesures est réalisée.

Lors de la réflexion sur la structure fluidique, une autre s'est ajoutée : celle de l'optimisation de la structure hyperfréquence. En effet, la structure à ce stade possédait une largeur de l'espace entre les deux électrodes (qui forment la capacité de détection) de 10 µm. Elle avait été optimisée par les doctorants précédents pour un objet d'étude de type cellule unique. Ainsi, la question de la validité de cette optimisation pour des objets trente fois plus gros que sont les sphéroïdes s'est posée. Nous y avons répondu par une étude à la fois expérimentale et par simulation électromagnétique, où cette largeur entre les deux électrodes a été augmentée jusqu'à 60 µm afin de tenter d'améliorer la sensibilité du dispositif RF.

Une fois la structure RF portant une largeur entre les deux électrodes et une structure fluidique avec piège mécanique optimisée obtenue, une validation a été réalisée avec des sphéroïdes dans deux cadres biologiques extrêmes (vivants et fixés par paraformaldéhyde).

Une conclusion permettra de reprendre point par point les développements réalisés dans ce Chapitre.

2 ETAT DE L'ART DES STRUCTURES DE PIEGE FLUIDIQUE

La technologie micro-fluidique, proposée comme outil biologique il y a 30 ans, permet de contrôler l'écoulement d'un minuscule volume de réactifs dans des micro-canaux dont la taille varie de 1 µm à 1000 µm. Dans ces conditions, l'écoulement des liquides est strictement laminaire (Mahhengam et al. 2021).

Le piégeage fluidique est une méthode qui utilise des barrières basées sur des phénomènes physiques ou des obstructions mécaniques pour séparer la particule cible du flux principal. Une fois séparées, les particules cibles sont retenues dans des sites de piégeage hydrodynamique, où elles peuvent être utilisées pour diverses études. Les structures typiques de piégeage des particules comprennent des parois et/ou des pores. Des réseaux constitués d'un motif de sites de piégeage peuvent aussi être réalisés pour capturer des particules biologiques. Les progrès réalisés dans les technologies au cours des dernières décennies ont permis le développement de divers systèmes micro-fluidiques pour le piégeage de cellules uniques (eucaryotes ou procaryotes) et de sphéroïdes (Narayanamurthy et al. 2017).

Il est possible de classer le piégeage des objets biologiques à l'aide de dispositifs micro-fluidiques en deux grandes catégories : les approches avec et sans contact. Une approche avec contact est considérée lorsqu'un contact entre la particule et la région de piégeage a lieu, pendant le processus de capture (Deng, Guo, et Xu 2020).

2.1 AVEC CONTACT

Les approches basées sur un contact peuvent être classées en deux principales méthodes : le piégeage vertical et le piégeage latéral. Ce qui les différencie, c'est le placement de la particule, après processus de piégeage, par rapport au flux initial de la microstructure. Lorsque les cellules ou les particules sont piégées verticalement par rapport à l'écoulement dans des micro-puits ou des micro-fosses, il s'agit de piégeage vertical. A l'inverse, lorsque les cellules ou les particules sont piégées latéralement par rapport au flux dans des obstacles ou des pièges, il s'agit d'un piégeage latéral (Narayanamurthy et al. 2017).

Le principe général repose sur le contrôle du débit relatif du fluide entre le piège et le canal de dérivation (Tan et Takeuchi 2007). Physiquement, ce mécanisme de piégeage des cellules peut être expliqué par l'approche Lagrangienne. Les forces alors exercées sur la cellule sont : la traînée de Stokes, le gradient de pression, les forces diffusives, élastiques et gravitationnelles (Deng, Guo, et Xu 2020).

2.1.1 Piège vertical

La principale méthode de piège vertical consiste en l'utilisation de micro-puits, de micro-piège : en somme des microstructures d'une taille proche de celle de la particule à piéger dans laquelle la particule vient se déposer par gravité (Luo et al. 2019). Ce qui piège alors la particule d'intérêt est généralement la gravité, tel que la Figure 1 a) et d) le représente.

Des systèmes plus ou moins compliqués permettent d'enlever les cellules en surplus de celles d'étude dans les micro-puits. Cette technique est beaucoup utilisée pour la culture et l'analyse des sphéroïdes puisqu'elle permet de former un sphéroïde à partir d'un nombre moyen de cellules, d'en contrôler la morphologie et la taille, et de l'analyser depuis son lieu de culture directement (Choi et al. 2020; Järvinen et al. 2020; Dadgar et al. 2020; S. W. Lee et al. 2019). De plus ce type de dispositifs est facile à concevoir et à utiliser (Moshksayan et al. 2018; Shao

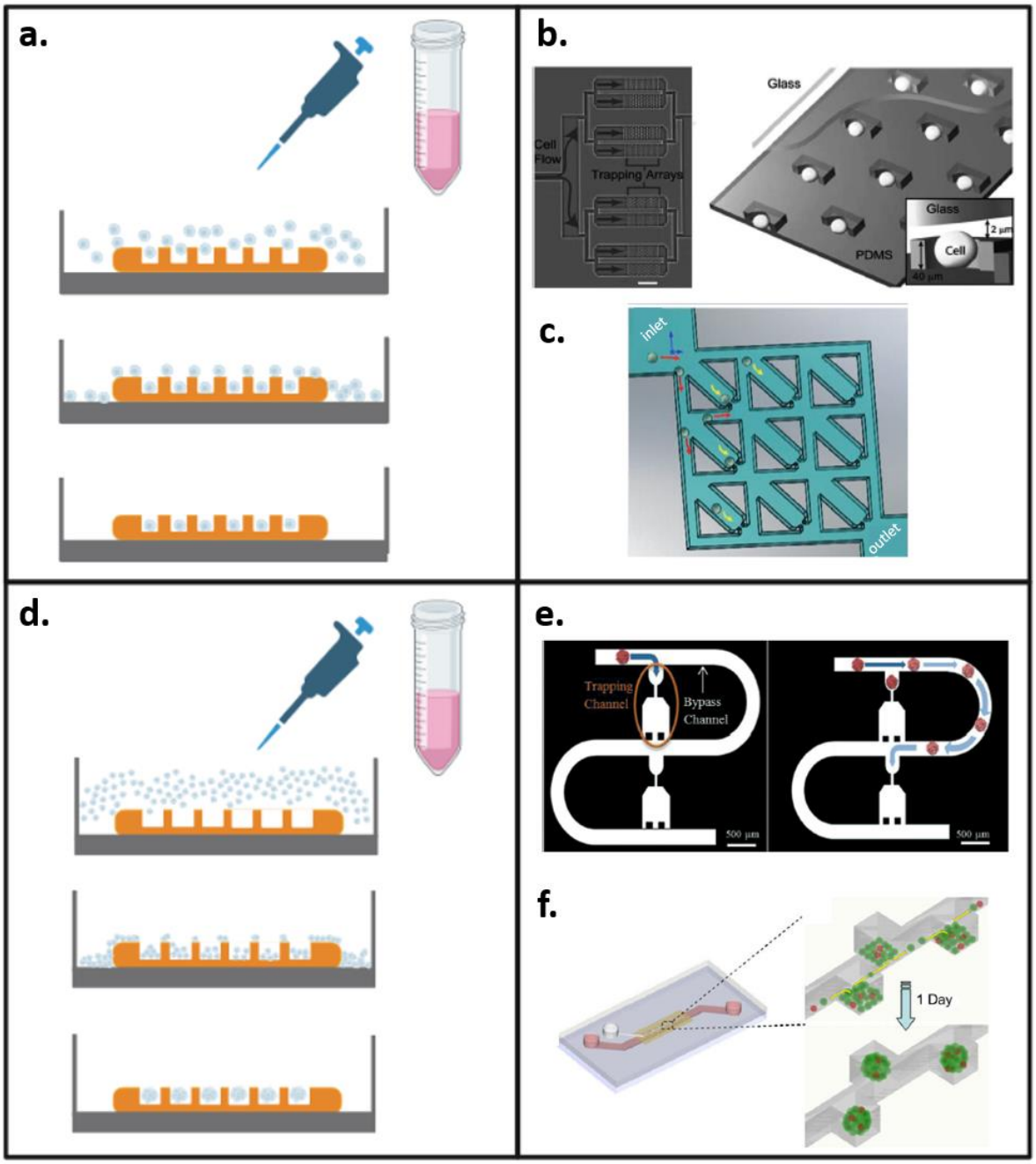


Figure 1 : Exemples de piège hydrodynamique avec contacts verticaux et latéraux en fonction de l'objet d'étude, cellule unique ou sphéroïdes. a) Schéma d'un système très simple de piège vertical pour l'analyse de cellule unique. b) et c) Deux systèmes différents de pièges latéraux pour l'étude de cellules uniques reproduit de la référence Di Carlo et al., 2006 pour b) et Mi et al., 2016 pour c). d) Schéma d'un système très simple de piège vertical de plusieurs cellules permettant, après quelques jours de culture, de faire l'analyse de sphéroïdes. e) et f) Exemples de deux systèmes permettant le piège latéral de sphéroïdes, reproduit à partir de Ruppen et al, 2014 et Hsiao et al, 2009 respectivement.

et al. 2020). En effet, il suffit de déposer une suspension cellulaire dans un dispositif comportant des micro-puits pour obtenir des sphéroïdes comportant une uniformité en taille et en morphologie. Le principal inconvénient de ce genre de technique est la difficulté de sortir l'objet étudié sélectivement du micro puit après les expérimentations. Kurakazu et al. ont cependant développé une technique basée sur la présence d'électrode au fond des puits permettant de créer des bulles (par l'application d'un courant électrique) sous le sphéroïde étudié et de le chasser de son puit. Cette technique n'endommage pas la viabilité des sphéroïdes après libération (Kurakazu et al. 2011). Des techniques de libération de tels dispositifs restent cependant rares et difficiles à mettre en place.

2.1.2 Pièges latéraux

Les pièges latéraux permettent de piéger la particule d'intérêt grâce, soit au flux du dispositif micro-fluidique directement, soit par l'intermédiaire de micro-valves fabriquées avec de la lithographie douce à plusieurs couches notamment. Ainsi une certaine dynamique est conservée et permet un renouvellement du milieu de culture utilisé. De nombreux dispositifs différents existent en fonction du nombre d'objets piégés, et de l'application recherchée. Les dispositifs les plus courants sont sous formes de U comme représenté dans l'exemple de la Figure 1 b) ou sous forme de S comme un exemple est illustré à la Figure 1 e).

Considérons d'abord les études faites à l'échelle de la cellule unique. De nombreuses structures cherchent à piéger le maximum de cellule unique pour réaliser des analyses à haut débit, de stress chimiques (D. Jin et al. 2015; Mi et al. 2016; Y. Liu et al. 2018; Feng et al. 2019; Chiang et al. 2020; Chai et al. 2021; Thiriet et al. 2020), comme les deux exemples sélectionnés dans la Figure b) et c). En effet, l'intérêt d'étudier l'échelle de la cellule unique étant d'étudier la diversité cellulaire, il est important d'avoir un nombre d'échantillons important pour en tirer néanmoins des conclusions significatives. Dans ces cas-là, il y a un grand intérêt à réaliser ses analyses de stresses chimiques avec uniquement de très petit volume (de l'ordre du nL) grâce à des dispositifs micro-fluidiques tel que développé par Sabounchi et al. (Sabounchi et al. 2006). La co-culture de cellules différentes pour étudier les jonctions entre cellules peut être intéressante notamment pour comprendre leur fonction exacte dans différents phénomènes biologiques. Cependant pour ce faire, il faut parvenir à piéger deux cellules de façon à ce qu'elles soient en contact entre elles mais sur une zone prédéfinie pour ne pas qu'elles soient contraintes d'être au contact l'une de l'autre. Avec une approche combinant des différences de résistance fluidique et un système de valve, Frimat et al. sont parvenus à développer un dispositif de ce type avec de nombreux réplica (Frimat et al. 2011). Dans tous les dispositifs réalisés, la libération des cellules piégées est toujours un objectif délicat à réaliser. La solution la plus simple est la présence d'un canal positionné juste derrière la cellule : par inversion du flux la particule repart par là où elle est arrivée (D. Jin et al. 2015; Mi et al. 2016; Y. Liu et al. 2018; Feng et al. 2019). D'autres dispositifs, utilisant des valves notamment pour le piégeage, comportent un canal secondaire, de façon à ce que, en fonction d'où le flux est dirigé dans l'un ou l'autre des canaux, la particule soit piégée ou libérée respectivement (Chai et al. 2021).

A l'échelle du sphéroïde, il est possible de différencier deux grands types de stratégies : soit des dispositifs de pièges de sphéroïdes après fabrication du sphéroïde comme un exemple est représenté sur la Figure 1 e) (Nishimura, Nie, et Takeuchi 2020; Ruppen et al. 2014; J.-Y. Kim et al. 2015), soit un piégeage d'un certain nombre de cellules afin de former le sphéroïde et de l'analyser directement à l'intérieur du dispositif comme dans la Figure 1 f) (Hsiao et al. 2009; Ota et Miki 2011; H.-J. Jin et al. 2011; McMillan, Boyd, et Zagnoni 2016). Le choix de la stratégie dépendra de l'étude qui sera réalisée même s'il est intéressant de noter que la deuxième stratégie est sur-représentée dans la littérature par rapport à la première. L'étude des premiers stades d'une tumeur demandant la fabrication de petits sphéroïdes (jusqu'à maximum 200 µm de diamètre) se prêtera très bien à des pièges de cellules (Kurakazu et al. 2011; Hsiao et al. 2009; Ota et Miki 2011; H.-J. Jin et al. 2011; McMillan, Boyd, et Zagnoni 2016). En revanche si l'étude veut porter sur des stades plus tardifs de la tumeur, à partir de l'apparition d'un cœur nécrotique jusqu'à l'étude de l'angiogenèse par exemple : la première stratégie est plus adaptée (Nishimura, Nie, et Takeuchi 2020; Ruppen et al. 2014; J.-Y. Kim et al. 2015).

2.2 SANS CONTACT

2.2.1 Hydrodynamique

2.2.1.1 Micro-fluidiques des gouttes

La micro-fluidique en gouttelettes suscite de plus en plus d'intérêt en raison de sa capacité à encapsuler des cellules et de nombreux réactifs dans un environnement à l'échelle micrométrique (Huebner et al. 2008). Il s'agit également d'une technique puissante pour l'encapsulation de cellules uniques à haut débit. La taille, la forme et l'uniformité des gouttelettes peuvent être contrôlées avec précision. Cette méthode nécessite généralement deux fluides non miscibles pour créer des microgouttelettes eau-dans-huile (E/H) mono-dispersées dont la taille varie du sub-micron à plusieurs centaines de microns (Zhu et Wang 2017). Comme le montre Figure 2 a), b) et c), trois types d'approche micro-fluidique de génération de gouttelettes sont généralement utilisés : la jonction en T, la focalisation du flux et le co-flux (D. J. Collins, Neild, et al. 2015). Cependant, les principes de base de ces trois approches sont les mêmes. Un fluide devient la phase dispersée pour former les gouttelettes et l'autre fluide devient la phase continue pour séparer les gouttelettes.

Pour l'analyse de cellule unique cette technique permet de rendre chaque gouttelette un laboratoire de test indépendant de tous les autres (Luo et al. 2019). A l'échelle du sphéroïde, elle est intéressante pour différentes raisons : (i) elle permet la fabrication de sphéroïde avec une régularité de la taille difficilement atteignable avec d'autres techniques, (ii) elle permet de fabriquer énormément de sphéroïdes en très peu de temps, (iii) elle permet de fabriquer des sphéroïdes de cellules quasiment impossibles à cultiver sous cette forme avec toutes les autres techniques, comme les cellules souches (Z. Wu et al. 2020; Fattahi et al. 2021; J. M. Lee et al. 2020; Langer et Joensson 2020; D. Lee et Cha 2020).

2.2.1.2 Micro-fluidique d'inertie

En tant que méthode de manipulation cellulaire transversale, la micro-fluidique inertielle est basée sur l'utilisation de forces inertielles sous débits élevés pour concentrer et trier en continu des cellules de différentes tailles et formes, comme illustré sur la Figure 2 d) (Di Carlo 2009). La micro-fluidique inertielle présente les avantages d'une structure de puce simple, d'un débit très élevé et d'un endommagement moindre des cellules, ce qui permet de maintenir un taux de survie cellulaire élevé pour la culture en aval. Cependant, l'interaction intercellulaire peut réduire considérablement l'efficacité de la concentration cellulaire.

2.2.1.3 Vortex

La méthode basée sur les vortex repose sur la génération d'un flux secondaire moyenné dans le temps, connu sous le nom de tourbillons à flux régulier (Lighthill 1978; Yan 1998), qui est généré par l'interaction entre les oscillations de fréquence du milieu fluide et le cylindre fixe dans un micro-canal pour piéger les cellules uniques. Par conséquent, l'approche tourbillonnaire est aussi appelée en anglais « single-cell hydrodynamic tweezer » (pince hydrodynamique pour cellule unique). Un exemple présenté dans la Figure 2 e) montre que

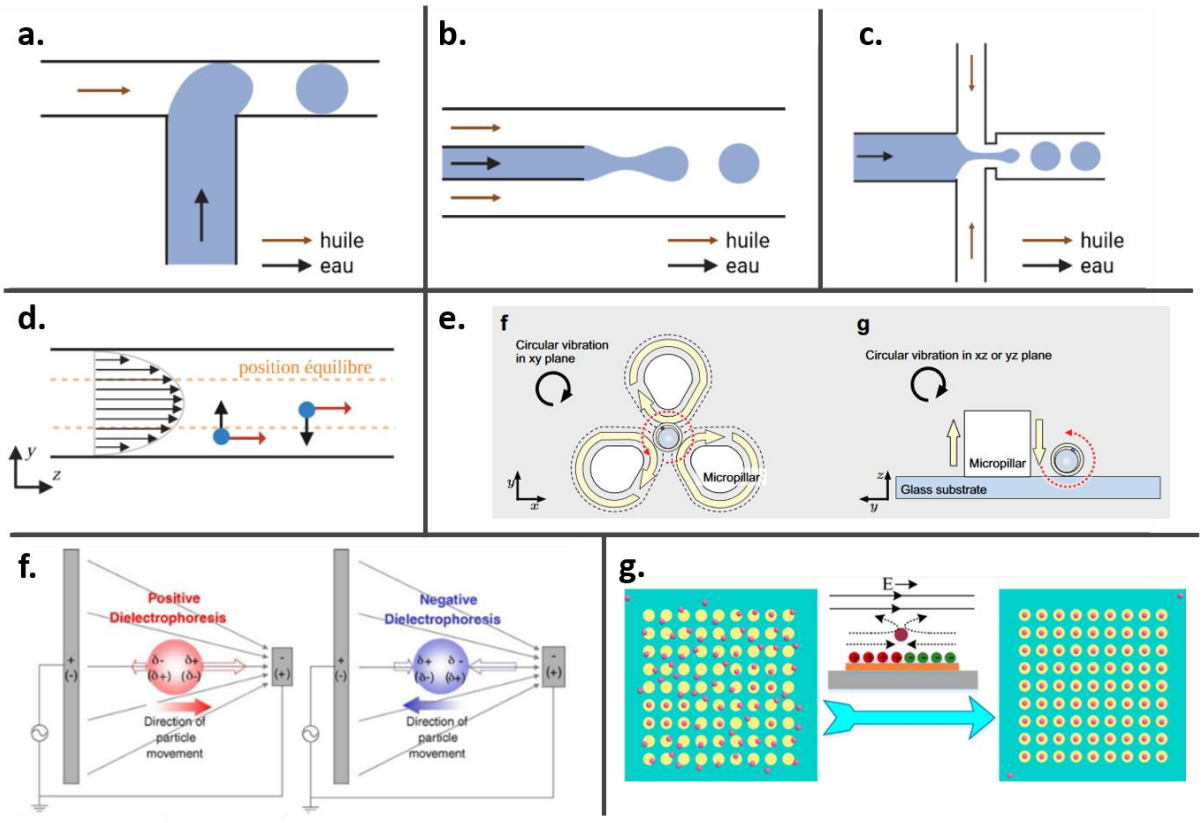


Figure 2 : Représentation schématique de différents fonctionnements de piégeage fluidique. a), b) et c) Représentation des trois principales techniques de fabrication de gouttelettes, respectivement par jonction-T, co-flux et focalisation du flux. d) Représentation schématique des systèmes micro-fluidiques d'inertie, reproduit à partir de Di Carlo, 2009. e) Représentation schématique d'un système comportant trois micro-piliers afin de piéger par vortex, reproduit à partir de Hayakawa et al , 2015. f) Représentation schématique du principe de fonctionnement de la diélectrophorèse, reproduit à partir de Luo et al , 2019. g) Représentation d'un piège électro-osmotique développé par Wu et al., 2016.

Hayakawa et al. ont adopté une structure comportant trois micro-piliers disposés dans une configuration triangulaire associé à un actionneur piézoélectrique *xyz* pour appliquer une vibration circulaire générant un tourbillon permettant de piéger des cellules uniques d'ovocytes de souris (Hayakawa, Sakuma, et Arai 2015). Cette méthode de vortex a aussi récemment permis de développer une nouvelle méthode d'imagerie de sphéroïde 100% sans contact avec une rotation à 360° à une vitesse modulable (X. Liu et al. 2018).

2.2.2 Méthodes électriques

Les méthodes électriques ont été largement utilisées pour piéger et modeler les cellules uniques car elles imposent généralement une pression physique plus faible sur la membrane cellulaire. Deux méthodes principales existent pour la manipulation unicellulaire contrôlée électroniquement : la diélectrophorèse (DEP) et l'électro-osmose (Luo et al. 2019).

2.2.2.1 Diélectrophorèse

La diélectrophorèse (DEP) est un moyen efficace de réaliser le piégeage des cellules dans les dispositifs micro-fluidiques. Le principe du piégeage cellulaire par DEP est d'utiliser la force DEP imposée à une particule diélectrique. Dans un champ électrique non uniforme, l'intensité de la force DEP dépend fortement de l'ampleur et de la polarité des charges induites sur une particule. La force DEP peut être qualifiée de positive ou de négative (Doh et Cho 2005). Sous l'effet de forces DEP positives, les cellules se déplacent vers des régions à fort champ électrique. En revanche, sous l'effet de forces de DEP négatives, les cellules se déplacent vers des régions à champ électrique faible. Le schéma de Figure 2 f) représente ces deux cas de figure. La fréquence du champ électrique lorsque la force DEP est nulle est appelée fréquence de croisement, à laquelle les forces DEP appliquées aux cellules sont nulles.

Les performances de manipulation des cellules de la puce DEP dépendent largement de la conception de l'électrode DEP. La DEP peut être facilement combinée avec des systèmes micro-fluidiques, ne nécessite pas de marquage préalable, et présente une grande sélectivité dans la manipulation des cellules rares. La plupart des systèmes de manipulation cellulaire par DEP nécessitent une solution à faible conductivité. Cependant, les solutions physiologiques, telles que le sang et l'urine, sont très conductrices. Ainsi, les échantillons de cellules nécessitent un prétraitement rigoureux. Cette exigence limite l'application des approches basées sur le DEP et a pu empêcher l'application de la manipulation cellulaire basée sur le DEP dans le domaine clinique (Luo et al. 2019).

2.2.2.2 Electro-osmose

Le flux d'électroosmose est causé par la force de Coulomb qui est induite par un champ électrique sur la charge électrique mobile nette dans une solution. Deux types d'électroosmose sont généralement utilisés pour la manipulation des cellules, à savoir l'électroosmose à courant alternatif (ACEO) et l'électroosmose à charge induite (ICEO). L'ACEO est induite par la migration des nuages ioniques en réponse à un courant tangentiel dont la fréquence appliquée est très inférieure à la fréquence de relaxation des charges du fluide. L'ICEO est un effet électrochimique qui se produit à la surface d'un objet et se manifeste par

un écoulement fluide non linéaire dans des conditions électriques. La diffusion de la charge induite, stimulée par le champ électrique, induit un glissement fluide local sous le champ appliqué. Les charges de diffusion induites sont distribuées dans la couche limite sur l'interface solide/liquide comme le représente la Figure 2 g) (Y. Wu et al. 2016).

2.2.3 Pièges magnétiques

La magnétophorèse est un autre moyen efficace de réaliser le piégeage des cellules dans les canaux microfluidiques. Le principe du piégeage des cellules par action magnétique consiste à appliquer une force magnétique sur une particule. Ce type de méthode de piégeage peut être classé en magnétophorèse positive et négative. La magnétophorèse positive est la migration d'une particule magnétique dans un milieu diamagnétique, tandis que la magnétophorèse négative se produit dans un milieu magnétique. En outre, si la susceptibilité de la particule/cellule est supérieure à celle du milieu ambiant, une magnétophorèse positive se produit également (Munaz, Shiddiky, et Nguyen 2018). Ces trois fonctionnements sont présentés dans la Figure 3 a).

La manipulation d'échantillons cellulaires à l'aide de billes immunomagnétiques est simple et fiable et de nombreuses plateformes analytiques à grande échelle pour des applications cliniques existent aujourd'hui. Cependant, les perspectives d'application de cette méthode sont limitées, étant donné qu'elle rencontre des difficultés à séparer et purifier simultanément plusieurs types de cellules et de séparer les billes magnétiques des cellules triées. En outre, la fixation des billes magnétiques peut endommager les protéines et la structure de la membrane cellulaire. Les cellules endommagées sont peu propices à une culture cellulaire ultérieure (Luo et al. 2019).

2.2.4 Pièges acoustiques

Une autre méthode pour le piégeage actif des cellules est le piégeage cellulaire à commande acoustique. Les ondes stationnaires ultrasoniques (USW) peuvent être utilisées pour le piégeage sans contact des cellules dans les canaux micro-fluidiques. Cette technique est basée sur l'interaction complexe entre l'écoulement et la structure qui se produit lorsque des ondes acoustiques pénètrent dans un canal micro-fluidique. Une onde acoustique de surface (SAW) est une onde acoustique élastique qui ne peut se propager que sur la surface du substrat. La fréquence de résonance des SAW peut être contrôlée en ajustant l'espacement interdigital des électrodes, elle peut atteindre jusqu'à quelques GHz, ce qui indique qu'elles peuvent contrôler avec précision des particules de taille microscopique ou même submicroscopique, permettant de l'utiliser pour le piégeage de cellules uniques comme de sphéroïdes (D. J. Collins, Morahan, et al. 2015; Cai et al. 2020). Un exemple de structure de ce type pour piéger neuf sphéroïdes répartis de façon à former un carré, est présenté dans la Figure 3 b).

La technologie acoustique pour la manipulation de cellules uniques présente les avantages de l'utilisation des hautes fréquences, d'une haute densité d'énergie, d'une bonne pénétrabilité, d'une facilité de fabrication, de l'intégration facile et d'un caractère non invasif.

Cependant, l'application du contrôle acoustique à la manipulation unicellulaire micro-fluidique n'en est qu'à ses débuts et pose de nombreux problèmes qui doivent encore être résolus. Ces problèmes incluent les interactions non linéaires entre les ondes acoustiques, les fluides et les cellules. De plus, les puces acoustiques actuelles sont principalement basées sur des substrats $LiNbO_3$, et des substrats basés sur de nouveaux matériaux piézoélectriques qui doivent encore être étudiés (Luo et al. 2019).

2.2.5 Pièges optiques

Deux principaux types de méthodes de manipulation optique des cellules existent : les pinces optiques et la diélectrophorèse induite par voie optique (ODEP).

2.2.5.1 Les pinces optiques

La pince optique est considérée comme une méthode efficace pour piéger les cellules à l'échelle microscopique (Molloy, Dholakia, et Padgett 2003). Elle utilise un faisceau laser focalisé pour induire une force optique, afin de réaliser la fonction de piégeage. Cependant, l'efficacité de capture de la pince optique n'est pas toujours élevée, en raison du faible contraste d'indice de réfraction de certaines cellules biologiques (W. Kim et al. 2010). L'amélioration de l'efficacité du piégeage des cellules biologiques à l'aide de la pince optique reste un défi (Nurunnabi et al. 2016; Parodi et al. 2017; Keloth et al. 2018). L'application la plus typique est le tri cellulaire micro-fluidique amélioré par la pince optique, représentée dans la Figure 3 c) (Wang et al. 2011).

Les pinces optiques offrent les avantages d'une grande précision, d'une absence d'intrusion et d'une manipulation de cellules uniques à haut débit. Cependant, la force laser exercée sur les cellules est généralement de l'ordre du pico-Newton. La manipulation des cellules sous un flux continu nécessite donc une faible vitesse du fluide, sinon les pinces optiques auront des difficultés à dévier les cellules. En outre, le système optique périphérique massif requis par cette technique est difficile à miniaturiser et est également très coûteux.

2.2.5.2 La diélectrophorèse optique

La diélectrophorèse à induction optique (ODEP) est une nouvelle technologie de manipulation des particules. Les forces utilisées pour manipuler les particules dans la puce basée sur l'ODEP sont les mêmes que celles utilisées dans la technologie DEP traditionnelle, c'est-à-dire qu'un champ électrique non uniforme est utilisé pour polariser les cellules et générer des forces DEP. La différence entre les deux technologies réside dans la technique par laquelle le champ électrique non uniforme est généré. Contrairement à la manipulation DEP conventionnelle, l'ODEP ne nécessite pas de motifs d'électrodes préfabriqués. Cependant, un projecteur numérique à micro-miroir peut être utilisé pour projeter le motif lumineux sur le substrat de la puce via un microscope afin de générer des électrodes virtuelles flexibles et contrôlables (Chiou, Ohta, et Wu 2005). Son principe de fonctionnement est similaire à celui de la production d'énergie photovoltaïque. Un matériau substrat en silicium amorphe génère des photons sous l'effet de l'excitation lumineuse, ce qui augmente la concentration de photons dans la zone d'illumination. Par conséquent, la conductivité électrique de la zone

d'éclairage augmente rapidement, générant ainsi un champ électrique non uniforme. L'ODEP peut également permettre la manipulation DEP de cellules uniques vivantes sans contact et sans marquage préalable. Comme le montre la Figure 3 d), Xie et al. ont utilisé la technique ODEP pour piéger et transporter efficacement des algues unicellulaires. Ils ont constaté que les cellules piégées ont commencé à tourner et ont démontré que les flagelles fonctionnels jouaient un rôle décisif dans cette rotation. En outre, ils ont également réalisé le contrôle de la vitesse de rotation en faisant varier l'intensité optique (Xie et al. 2017).

Le système ODEP est considérablement plus simple que les systèmes de pinces optiques et peut être miniaturisé. De plus, l'ODEP peut manipuler des cellules qui ne sont pas optiquement transparentes, ce qui lui confère une grande flexibilité. Cependant, l'ODEP et ses applications cliniques sont entravées par les mêmes inconvénients inhérents à la DEP traditionnelle : la manipulation de cellules dans des solutions à faible conductivité. De plus, le substrat de la puce ODEP est opaque en raison du dépôt de silicium amorphe. L'opacité du substrat empêche l'utilisation d'un microscope biologique inversé pour l'imagerie des cellules vivantes (Luo et al. 2019).

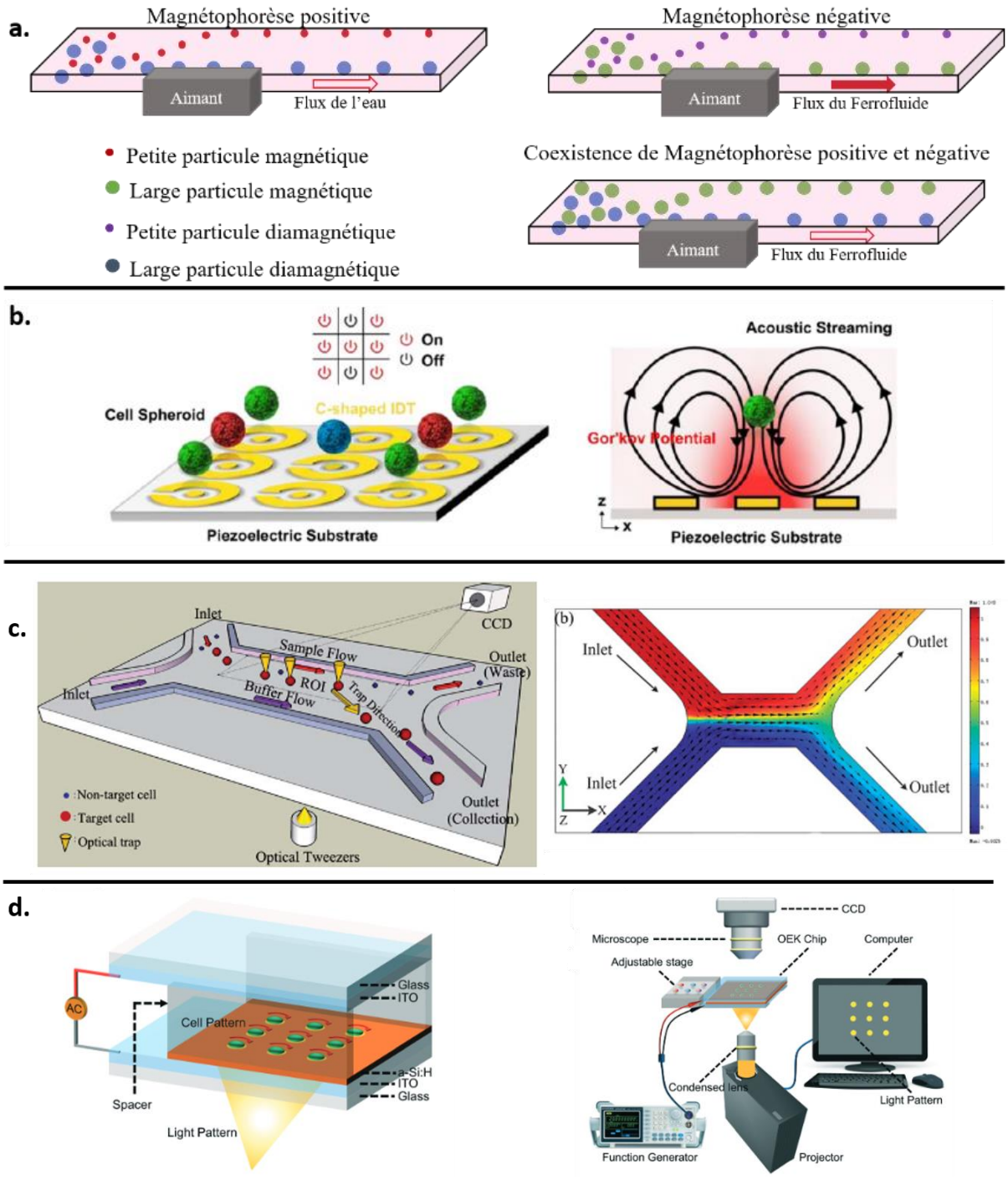


Figure 3 : Représentation schématique de systèmes de piégeage sans contact de particule biologique. a) Trois principaux fonctionnements de la magnétophorèse, reproduit à partir de Munaz et al., 2018. b) Exemple d'un système de piège utilisant les ondes acoustiques, reproduit à partir de Cai et al., 2019. c) Exemple de pinces optiques permettant de trier des cellules cibles du reste du contenu du mélange dans lequel les cellules se trouvaient, reproduit à partir de Wang et al., 2011. d) Exemple de diélectrophorèse optique permettant de piéger des cellules sur des positions définies préalablement, reproduit à partir de Xie et al., 2017.

2.3 CONCLUSIONS DE L'ETAT DE L'ART

Quelques décennies se sont écoulées depuis que les microsystèmes ont commencé à être appliqués à la recherche cellulaire. Il existe aujourd'hui un très grand nombre de microsystèmes uniques qui diffèrent en termes de principes d'ingénierie, de conception, de fabrication, de fonctionnement et de microenvironnement pour la culture en 3D de différents types de cellules, comme pour la manipulation de cellules uniques. Ces systèmes ont apporté de la polyvalence dans le domaine de la recherche cellulaire en fournissant des plateformes pour de nombreux types de cellules et leurs applications biologiques.

Le piégeage fluidique peut être réalisé avec ou sans contact de la particule étudiée : la première catégorie est répartie en deux méthodùes dites latérales et verticales ; la deuxième catégorie, comporte de nombreuses techniques différentes réparties selon les méthodes électriques, magnétiques, optiques, acoustiques et hydrodynamiques. Il semble important de noter que chacune des méthodes décrites ici possède des avantages et des inconvénients inhérents à la technique. Généralement, les méthodes hydrodynamiques permettent de réaliser des études à haut débit d'échantillons biologiques mais ont des déficiences de flexibilité et d'exactitude.

Les méthodes telles que les méthodes électriques et optiques sont d'une grande précision et d'une grande souplesse, mais elles présentent des inconvénients tels qu'un faible débit. Il n'existe donc pas de méthode unique permettant de réaliser simultanément des tâches de manipulation et d'analyse de cellules uniques et de sphéroïdes à haut débit, à haut rendement et précise.

Il s'agissait de présenter ici toutes les méthodes de pièges fluidiques afin d'identifier celles qui seraient utilisables pour l'application précise de cette thèse : le piégeage de sphéroïdes de façon précise et répétable sur l'espace entre les deux électrodes qui forment la capacité de détection ; tout en permettant de le conserver dans un environnement de culture viable. Cependant, à ce stade il est assez difficile de se projeter sur l'utilisation de telle ou telle technique de piège fluidique tant il y a de possibilités. De plus, les méthodes de caractérisations électriques pour étudier l'échelle intermédiaire du sphéroïde ne sont implémentées que sur certaines gammes de fréquences (de 0Hz à quelques centaines de MHz seulement) (Alexander, Price, et Bhansali 2013; Curto et al. 2018; Gerasimenko et al. 2020). Or pour étudier des cellules uniques, des pièges fluidiques sont aussi nécessaires, et à ce stade, des dispositifs existent dans toutes les gammes de fréquence. Ainsi, pour comprendre les avantages et les inconvénients cruciaux pour le cas des capteurs RF, il nous a semblé pertinent de réaliser une synthèse de ceux utilisés à l'échelle de la cellule unique pour compléter cet état de l'art.

3 CAS DES CAPTEURS RF A L'ECHELLE DE LA CELLULE UNIQUE

La spectroscopie diélectrique appliquée aux objets biologiques vivants demande un développement du dispositif fluidique afin de ne pas perturber le fonctionnement de base de ceux-ci, ce qui fausserait les résultats. Cependant ce sont des techniques qui ont besoin d'électrodes pour fonctionner et donc le placement de l'objet biologique étudié doit être connu pour la plupart d'entre elles ce qui nécessite une méthode de piège dès que l'on cherche à réaliser la mesure de cellules uniques. En effet, l'hétérogénéité dans les populations cellulaires n'est pas à démontrer mais elle peut être très importantes lorsqu'il s'agit d'expliquer des phénomènes pathologiques, d'où l'importance de l'étudier (Morgan et al. 2007; Zhao Zhang et al. 2021). En théorie, n'importe quelle méthode de piégeage est compatible avec les méthodes de mesures des caractéristiques diélectriques des objets biologiques, à condition qu'elle n'interfère pas avec les signaux mesurés. Dans la pratique certaines méthodes complexifieraient grandement les bancs de tests comme par exemple les méthodes par ciseaux optiques ou par magnétophorèse.

Choisir une méthode de piège qui permettent de maitriser parfaitement le positionnement de l'objet sans pour autant lui appliquer un trop grand stress qui perturberait son fonctionnement, et donc possiblement ses caractéristiques électriques, demande réflexion et compromis. Ainsi les méthodes les plus utilisées dans les capteurs RF sont facilement intégrables dans des dispositifs comportant des électrodes comme les pièges avec contact (latéraux ou verticaux) et, parmi les pièges sans contact : les pièges hydrodynamiques et les pièges utilisant la DEP. De nombreux designs de dispositifs existent en fonction de la technique utilisée pour mesurer les caractéristiques électriques (et donc les possibilités qu'elle offre sur la morphologie des électrodes notamment), la gamme de fréquence choisit, ou encore de l'application recherchée. Le Tableau 1 ressence une sélection représentative de dispositifs appliqués à l'étude de cellules cancéreuses.

Chacun de ses dispositifs possèdent des avantages et des inconvénients inhérents à la technique d'analyse, notamment la cytométrie en flux est dépendante du positionnement de la particule lorsqu'elle traverse les électrodes, sauf dans le cas de l'utilisation de restriction du canal fluidique (Morgan et al. 2007; Petchakup, Li, et Hou 2017). Cependant, dans ce cas, le haut débit est perdu et un certain stress est appliqué aux cellules coincées.

La Spectroscopie Electrique d'Impédance (EIS) ne permet pas aisément de monter en gamme de fréquence au-delà d'une centaine de MHz et il est quasi impossible sans électrode restructurée en surface de faire des mesures directement dans le milieu de culture parce qu'ils sont trop chargés en ions.

La DEP possède un problème similaire puisqu'il faut travailler dans un milieu particulier pour que cette technique fonctionne, rendant quasi impossible les mesures en temps réel sans endommager les objets étudiés (Zhao Zhang et al. 2021; Russo et al. 2021).

Enfin, pour la spectroscopie diélectrique, le positionnement au plus proche de l'objet biologique étudié est important afin d'obtenir la meilleure sensibilité possible. De plus, les

structures fluidiques doivent être minimisées parce qu'elles sont sources de pertes en hyperfréquences. Ainsi le blocage par piège latéral semble particulièrement intéressant pour plusieurs raisons. D'abord, puisqu'il permet de réaliser des mesures en temps réel pour le suivi de processus biologiques, sans interférer avec l'élément biologique. Ensuite, parce qu'il est facile à manipuler ; et enfin, parce qu'il est facile à intégrer à un biocapteur déjà existant.

Il est important de rappeler qu'il n'existe aucun dispositif fluidique permettant de bloquer un sphéroïde et de l'étudier de façon électrique. C'est ce que nous nous attèlerons à développer ici.

Tableau 1 : Comparaison des pièges fluidique de cellule unique cancéreuse utilisée en fonction de la caractérisation électrique choisit (dépendant de la gamme de fréquence de travail) et de l'application associée. DEP = Diélectrophorèse, EIS = Spectroscopie Electrique d'Impédance et ECIS = Détection d'Impédance Electrique Cellule-substrat.

Premier auteur (année)	Techniques de piège	Techniques de mesure	Gamme de Fréquence	Cellules ciblées	Applications	Réf.
Spencer (2014)	Cytométrie en flux		0.5 MHz, 2 MHz	MCF-7	Reconnaissance des cellules	(Spencer, Hollis, et Morgan 2014)
Han (2015)	Cytométrie en flux		500 kHz, 10 MHz	DLD-1	Reconnaissance des cellules	(Han et Han 2015)
Desai (2019)	Cytométrie en flux		250 kHz	Thyroïde, poumon, poitrine et cancer des ovaires	Reconnaissances de cellules	(Desai, Coston, et Berlin 2019)
McGrath (2020)	Cytométrie en flux		500 kHz – 50 MHz	6 lignées pancréatiques et 1 d'adénocarcinome	Criblage de cellules	(McGrath et al. 2020)
Ostermann (2020)	Cytométrie en flux		6 MHz	U937	Test de viabilité	(Ostermann et al. 2020)
Chien (2018)	Cytométrie en flux		6.5, 11, 17.5, 30 GHz	MCF-10A, MDA-MB-231, THP1, K-562	Criblage cellulaire	(J.-C. Chien et al. 2018)
Zhao (2016)	Rétrécissement du canal fluidique	Cytométrie en flux	1 kHz, 100 kHz	A549, H1299	Criblage de cellules	(Zhao et al. 2016)
Ren (2019)	Rétrécissement du canal fluidique	Cytométrie en flux	1 kHz, 10 kHz, 100 kHz, 1 MHz	MDA-MB-231	Reconnaissance de cellules	(Ren et al. 2019)
Zhang (2020)	Rétrécissement asymétrique du canal fluidique	Cytométrie en flux	100 kHz, 250 kHz	A549, HepG2	Criblage de cellules	(Y. Zhang et al. 2020)
Hong (2012)	DEP		20 kHz, 101 kHz	MDA-MB-231, MCF-7, HeLa	Caractérisation électrique de cellules cancéreuses	(Hong, Lan, et Jang 2012)
Lambert (2022)	DEP	DEP Ultra Haute Fréquence	0 – 500 MHz	Glioblastome de plusieurs sous types de cellules souches	Discrimination entre cellules souches et non cellules souches	(Lambert et al. 2022)
Zhang (2020)	DEP	ECIS	100 kHz	HeLa, MCF-7, 293T	Contrôler le procédé de rétablissement après électroporation	(Zhizhong Zhang, Zheng, et Zhu 2020)

Tableau 1 (suite)

Premier auteur (année)	Techniques de piège	Techniques de mesure	Gamme de Fréquence	Cellules ciblées	Applications	Réf.
Nguyen (2013)	Piège latéral	ECIS	100 Hz – 1 MHz	MDA-MB-231, MCF-7	Contrôler la capture des cellules, l'adhésion et la prolifération	(Nguyen et al. 2013)
Tsai (2016)	Piège latéral	EIS	10 kHz – 100 kHz	HeLa	Caractérisation électrique	(S.-L. Tsai et Wang 2016)
Park (2016)	Piège verticaux (à pression négative)	EIS	5 kHz – 1 MHz	TCCSUP	Reconnaissance de cellules	(Park et al. 2016)
Tang (2017)	Piège verticaux	EIS	1.953 MHz – 1 MHz	MCF-7	Contrôler la capture des cellules + criblage de cellules	(Tang et al. 2017)
Bakhtiari (2022)	Micro-puits – piège vertical	EIS	10 kHz – 40 MHz	PC3	Caractérisation électrique en temps réel	(Bakhtiari et al. 2022)
El Hasni (2017)	Piège hydrodynamique	EIS	2 – 5 MHz	Ovocyte de souris	Caractérisation électrique	(El Hasni et al. 2017)
Meyne (2017)	Piège vertical très petit (pL)	Résonateurs	2,93 GHz, 5.73 GHz	CHO	Caractérisation diélectrique	(Meyne et al. 2017)
Liu (2018)	Piège latéral	Résonateur	2.17 GHz	B16F10	Détection cellulaire	(C.-F. Liu, Wang, et Jang 2018)
Du (2021)	Piège latéral	Spectroscopie d'impédance Ultra Large Bande	9 kHz – 9GHz	Lymphocyte Jurkat	Détermination des paramètres électriques jusqu'au noyau cellulaire	(Du et al. 2021)
Chen (2013)	Piège latéral	Spectroscopie diélectrique	40 MHz – 40 GHz	Lymphome B	Caractérisation diélectrique	(T. Chen et al. 2013)
Tamra (2016, 2017, 2019 et 2022)	Piège latéral	Spectroscopie diélectrique	40 MHz – 40 GHz	THP1 et HCT116	Contrôle d'électroporation et d'électro-chimiothérapie	(Amar Tamra et al. 2016; s. d.; 2022; A. Tamra et al. 2019)
Zedek (2017)	Piège latéral	Spectroscopie diélectrique	40 MHz – 40 GHz	THP1	Criblage de test chimique	(Zedek, Dubuc, et Grenier 2017)

4 PARTIE A : OPTIMISATION FLUIDIQUE DU CAPTEUR

4.1 CHOIX DE LA CONFIGURATION DU PIEGE FLUIDIQUE POUR SPHEROÏDE, DEVELOPPEMENT ET PREMIERE PREUVE DE CONCEPT

4.1.1 Choix de la solution de piégeage de sphéroïdes

Lors de précédents travaux dans l'équipe, un choix avait été fait d'implémenter un piégeage mécanique pour l'analyse RF de cellules individuelles. Ce choix avait été fait en raison de l'adéquation que conférait la topologie d'un piège mécanique par rapport aux contraintes de la mesure RF.

Ainsi, plusieurs pièges fluidiques avaient été fabriqués et évalués pour le piégeage mécanique de cellules uniques : un piège dit Flotteur, un piège dit Pont et un piège dit Canyon comme représenté à la Figure 4 a) (Tong Chen 2012; CHEN 2016). Les géométries physiques de la structure du piège, avec une face concave, sont conçues pour piéger seulement une cellule. Les trois modèles de pièges ont la même dimension globale et diffèrent par la géométrie de la zone de fuite de liquide. Ils se distinguent en effet par la taille de leur espacement qui permet de laisser passer une fraction de fluide et dirige la cellule arrivant face au piège vers celui-ci. Le piège Pont est composé de deux piliers latéraux au gap capacitif, impliquant un espacement en son centre. Le piège Flotteur est flottant avec un passage possible du liquide sous toute sa surface basse, entre son fond et le substrat. Ce piège est maintenu en place grâce à son collage avec le capot fluidique. Enfin, le piège Canyon est

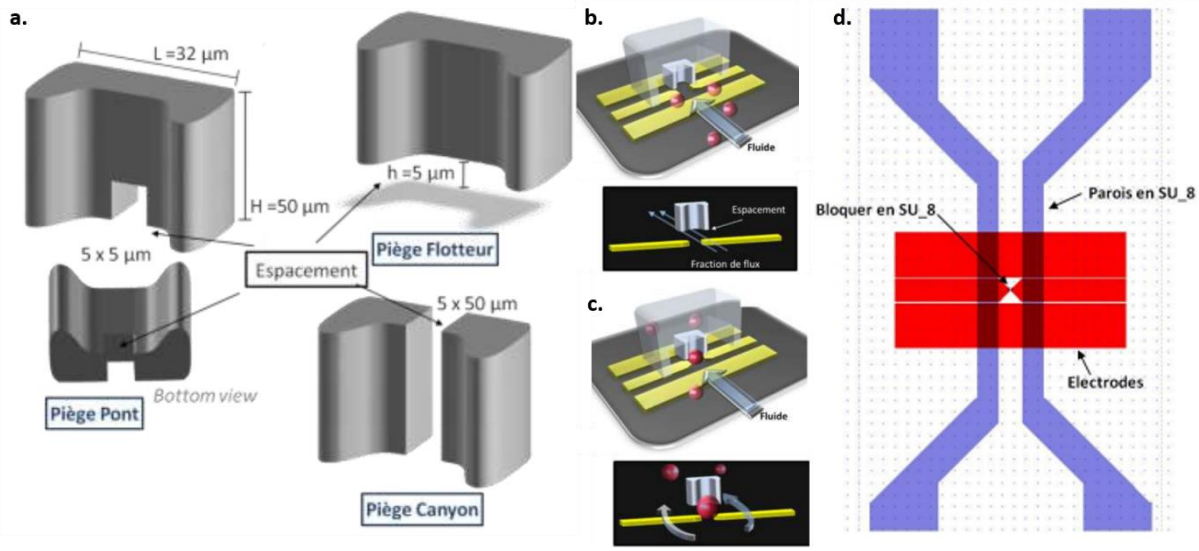


Figure 4 : a) Schéma des trois designs testés pour la mesure de cellule unique. b) Schéma de fonctionnement de la structure retenue avant qu'une particule soit bloquée. c) Schéma du fonctionnement de la structure lorsqu'une particule est bloquée avec schéma du fluide qui passe de part et d'autre du bloqueur. d) Schéma représentant la structure dans son ensemble avec la structure fluidique en entonnoir en haut et en bas de la structure RF. Reproduit de Chen, 2012 et Chen, 2016.

constitué d'un passage fendu ('Canyon') en son centre sur toute la hauteur du canal fluidique. Il est attaché à la fois au substrat et au capot fluidique.

De ces trois possibilités, le plus efficace selon trois critères s'est révélé être le piège flotteur. En effet, le temps de blocage de la particule est de 10 à 30s, il est possible de libérer la particule par inversion du flux et le nombre de piégeage consécutif sur 10min est de plus de 5 cellules. Les résultats expérimentaux avaient alors été confirmés avec des simulations réalisées sur COMSOL®. En effet, comme le représente la Figure 4 b) lorsqu'il n'y a pas de cellule bloquée, la vélocité du fluide est maximale dans l'espace sous la surface du piège, attirant la cellule dans le piège. Lorsque la cellule est bloquée le fluide est dévié autour, ce qui empêche complètement la possibilité à une autre cellule de se bloquer. Ce qui maintient alors la cellule en place dans son piège, c'est le fluide permanent qui peut continuer à s'écouler de part et d'autre du piège.

Fort de cette expérience, la réflexion pour le piège de sphéroïde nous orientait vers l'équivalent d'un piège flotteur mais à l'échelle de sphéroïde de 300µm de diamètre. Cependant l'ouverture sous le piège se devait d'être bien plus grande que pour la cellule unique (5 µm pour un diamètre moyen de bille de 10 µm) : de l'ordre de 100 à 150 µm. De plus la hauteur du canal fluidique allait être au moins de 400 µm afin de pouvoir y faire passer des sphéroïdes de 300 µm (au lieu de 50 µm dans le cas de cellules uniques). Des questions d'ordre technique sur la micro-fabrication d'une telle structure sont alors entrées dans la réflexion. En effet, réaliser une telle structure nécessitait qu'un piège d'environ 300 µm de hauteur sur 300 µm de largeur, même d'une épaisseur disons de 150µm soit tenue par sa seule adhérence au capot fluidique de la structure sans s'effondrer sous son propre poids, ce qui parait, à cette échelle-là, quasi impossible. Dans les deux autres structures proposées, le piège canyon avait aussi de très bons résultats à l'échelle du piège de la cellule unique mais ne permettait pas d'être sûr que le sphéroïde serait plaqué sur les électrodes. Or, l'expérience des limites de la précédente structure fluidique ouverte (présentée dans le chapitre précédent), montrait que le contrôle du positionnement en z de notre particule étudiée était un paramètre incontournable lors de l'analyse d'une structure 3D grâce à des électrodes coplanaires. Ainsi, la réflexion s'est orientée naturellement sur la dernière structure de piège, dite en pont permettant une fabrication assez simple et ne comportant aucun problème d'effondrement de la structure anticipable à ce stade. Restait à déterminer la hauteur du canal central permettant d'entrainer le sphéroïde au centre du piège et à contrôler son positionnement en z. En restant sur une analyse sphéroïde unique, la structure s'imaginait comme suit : un piège mécanique au centre du canal fluidique permettant un bon positionnement du sphéroïde sur les électrodes et des canaux latéraux plus petits que le canal central permettant que le sphéroïde soit attiré au centre par le flux maximum et surtout, une fois l'objet positionné, permettant de maintenir un flux constant dans la structure.

4.1.2 Preuve de concept par la fabrication de piège en technologie PDMS

Afin de fabriquer et tester rapidement et à moindre coup les premiers prototypes de piégeage fluidique de sphéroïde, le PolyDiMéthylSiloxane (PDMS) s'est imposé comme une évidence. En effet, ce matériau est l'un des plus utilisés dans la communauté micro-fluidique parce qu'il est biocompatible, transparent à l'oxygène et au CO2 mais aussi parce que la précision des structures fabriquées peut aller jusqu'au nanomètre (Halldorsson et al. 2015; Shakeri, Khan, et Didar 2021; Raj M et Chakraborty 2020; Torino et al. 2018). Sa fabrication est basée sur l'utilisation de moule permettant d'y couler le PDMS sous sa forme liquide, puis de le laisser se durcir dans une étuve à 60°C (un temps donné) de minimum 3h (qui dépend de la dureté souhaitée pour la structure finale) avant le démoulage. La structure ainsi

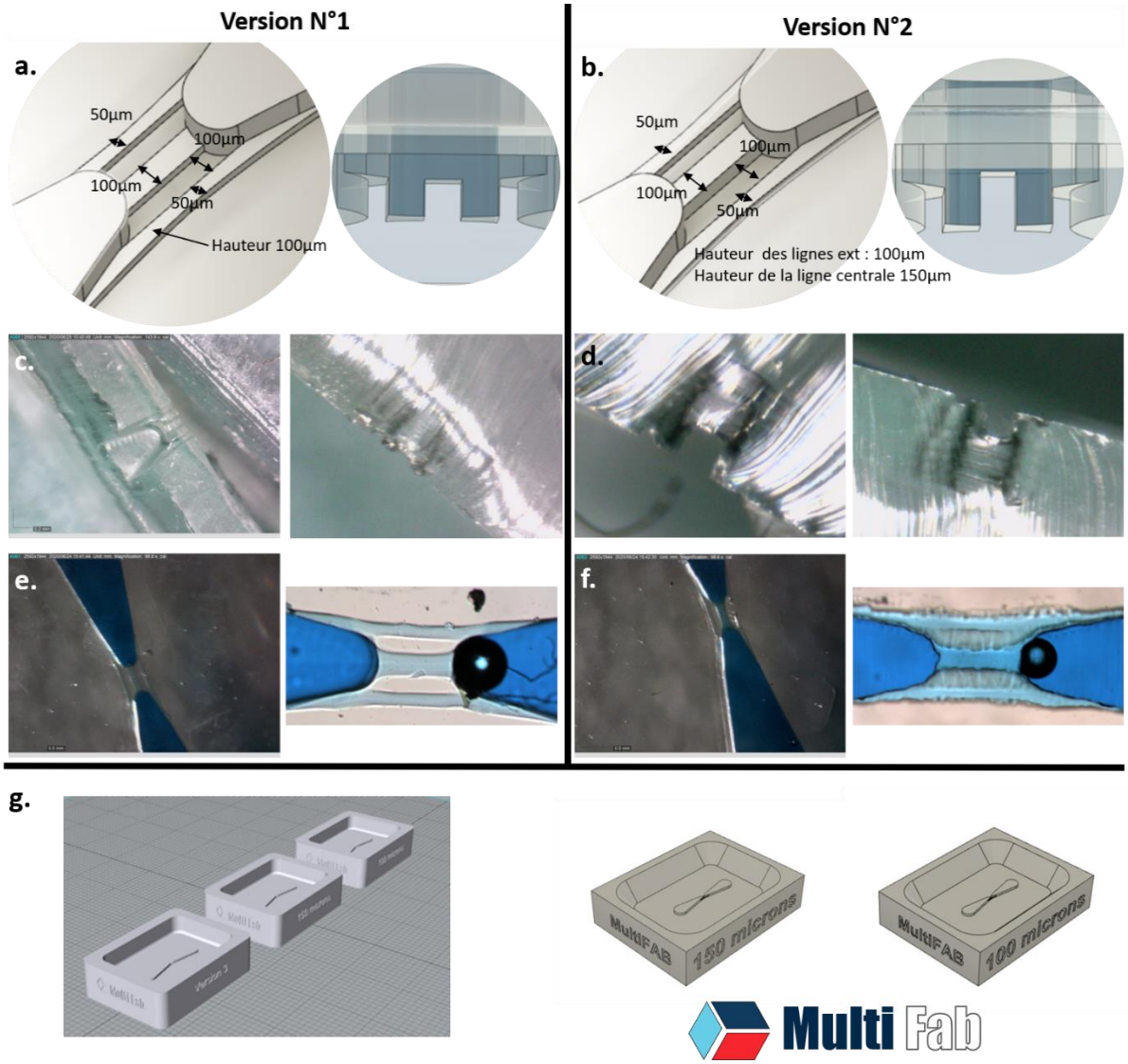


Figure 5 : Développement du piège fluidique par le dessin et la fabrication de dispositifs fluidiques en PDMS. a, et b) Représentations schématiques (à gauche du moule, à droite du PDMS) avec les côtes des deux versions de blocage que nous avons testées. c) et d) Photos par DinoLite des dispositifs obtenus après démoulage du PDMS après coupe verticale au niveau du piège fluidique. e) et f) Dispositifs fluidiques remplis avec de l'eau colorée et une bille de polystyrène afin de contrôler l'efficacité du piège fluidique. g) Vue globale des deux versions de moules, la première avec des angles à 90° puis avec des angles à 45°.

fabriquée peut ensuite adhérer sur du verre après un traitement plasma de la structure PDMS ainsi que le verre. Sa fabrication très rapide et peu coûteuse est donc parfaite pour réaliser des études préliminaires et un prototypage efficace.

Une collaboration avec le MultiFab du LAAS-CNRS par l'intermédiaire de Julie Foncy a été menée afin de fabriquer les moules de PDMS en impression 3D, d'aider à la fabrication des structures PDMS et à leur caractérisation. Les deux premières structures choisies sont présentées dans la Figure 5 a) et b), le premier comportant un canal central de 100µm de large et deux canaux latéraux de 50µm de large, tout trois ayant une hauteur de 100µm ; le second différant du premier seulement par la hauteur du canal central de 150µm.

Les moules, représentés à la Figure 5 g), des deux versions de structures fluidiques ont été fabriqués en résine DS3000. Ils ont ensuite subi un traitement perfluorodecyltrichlorosilane (FDTS) les rendant hydrophobe afin d'assurer un meilleur démoulage du PDMS. Une amélioration cependant a été réalisée sur les moules en résine, visibles sur la Figure 5 g) avec des bords à 45° qui facilitent le démoulage des structures PDMS par rapport à des bords à 90°.

Les premiers démoulages des structures PDMS ont d'abord été coupés au niveau du piège afin de vérifier la conformité du PDMS par rapport au moule réalisé, comme indiqué sur la Figure 5 c) et d). Ensuite, d'autres structures ont été fabriquées et collées sur des lamelles de verre afin de tester les capacités d'étanchéité fluidique ainsi que l'efficacité du piège mécanique avec une bille de polystyrène dans de l'eau colorée avec un colorant alimentaire. Sur la Figure 5 e) et f) sont présentés les résultats de cette première phase de caractérisation. Les structures sont parfaitement étanches dans les deux versions et le piège mécanique fonctionne. Il est même possible de remarquer que la bille est bien positionnée au plus bas du piège grâce aux mises au point successives sur la bille de polystyrène puis au niveau du bas du piège, et ce pour les deux versions de hauteur du canal central (100 et 150µm).

Ces premiers tests étant couronnés de succès, il fallait à présent essayer d'utiliser ces structures fluidiques en PDMS directement sur les dispositifs RF. Un protocole de re-découpe des structures et d'adhésion a dû être développé afin de pouvoir accéder au posé des pointes RF. En effet, la fabrication de moule portant des murs beaucoup plus fins que ceux existants allait rendre le démoulage particulièrement compliqué, c'est pourquoi la découpe avec une lame de rasoir après démoulage a été préférée. Cette découpe se réalise sous loupe binoculaire afin de ne découper le PDMS uniquement là où les pointes RF doivent accéder au guide d'onde coplanaire CPW, formant des structures fluidiques en forme de sablier. Des premiers tests d'adhésion du PDMS sur des plaquettes comportant le CPW avec pont à air de la structure présentée au chapitre précédent : c'est-à-dire première métallisation, passivation SU8 et deuxième métallisation des ponts à air. Cependant, le traitement plasma O2 ne permet pas d'activer la SU8 (Gajasinghe et al. 2014), rendant impossible l'adhésion des structures PDMS sur les micro-dispositifs. Il aurait fallu réaliser des traitements chimiques des dispositifs et du PDMS pour lui permettre d'adhérer à la surface de SU8 sans certitude que ceux-ci n'altèrent pas la surface des électrodes notamment (Gajasinghe et al. 2014; Byun, Coleman, et Kim 2013; Casanova-Moreno et al. 2017; C. Yang et Yuan 2016). La solution qui a été choisie

fut plutôt de fabriquer des dispositifs RF qui ne comportent que la première métallisation sans passivation SU8. Ainsi, un traitement plasma O_2 de 30s et un recuit à 60° de 3h étaient suffisants pour faire adhérer le PDMS à la structure RF. Les structures ainsi obtenues sont présentées à la Figure 6 a).

Avec ces structures nouvellement fabriquées, des tests fluidiques ont été réalisés avec du PBS. Ils ont révélé que la structure était étanche uniquement pendant un temps limité. Au niveau du positionnement des pointes RF où les murs fluidiques en PDMS avait été particulièrement affinés par la découpe, du PBS s'échappait. En effet, l'adhésion du PDMS sur le verre supporte la pression d'un fluide que si la surface d'adhésion est suffisante. Cette condition n'était plus vérifiée après une quinzaine de minutes d'expérimentations sur ces structures. Quinze minutes laissant quand même le temps de tester le piégeage d'une bille de polystyrène. Une bille a pu être positionnée avec succès à l'intérieur du dispositif. Cependant, elle restait bloquée sur la paroi du PDMS comme le montre l'un des zooms sur la Figure 6 d), sans pouvoir la faire bouger.

Les tests sur les dispositifs RF ne permettant pas de mesurer ni du PBS seul, ni d'un quelconque objet à cause d'un manque d'étanchéité au niveau du contact des pointes avec le capteur RF, il fallait passer à un processus de micro-fabrication en salle blanche qui permet de contrôler parfaitement les dimensions fluidiques tout en assurant une adhésion du canal fluidique sur la structure RF.

Ces premiers développements nous ont donc confortés (1) dans la conception de notre piège adapté aux sphéroïdes et (2) son adéquation avec la structure RF.

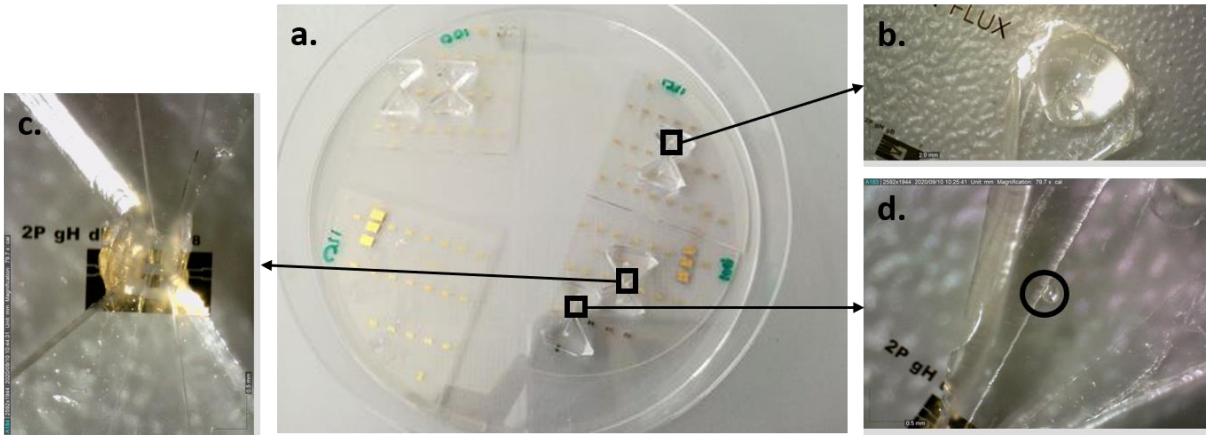


Figure 6 : Tentative de fixation du PDMS sur des structure RF. a) Photo d'ensemble des différents tests réalisés. b) Photo zoomée sur l'entrée fluidique entouré d'un carré noir en haut à droite de la structure. c) Photo de la partie centrale (encadré d'un carré noir sur la photo a) coupée à la main avec une lame de rasoir pour poser les pointes hyperfréquences sur les accès CPW. d) Photo d'un test de piégeage d'une bille de polystyrène (dans le cercle noir) qui s'est « collée » sur la paroi du canal PDMS (encadré d'un carré noir dans la photo a) sans jamais pouvoir l'en sortir.

4.2 MICRO-FABRICATION DU DISPOSITIF FLUIDIQUE DIT FERME

4.2.1 Description du dispositif RF fluidique avec piège mécanique

Comme le montre le schéma de la Figure 7 a), le biocapteur à micro-ondes est composé d'un guide d'onde coplanaire avec un espace capacitif situé au centre de la structure. Les accès coplanaires sont élargis à l'entrée et à la sortie RF, par rapport à la structure du capteur ouvert présenté dans le Chapitre 2 de cette thèse, pour permettre le positionnement des murs fluidiques de 250µm de large et des pointes RF. La largeur de l'accès CPW comportant le signal est de 130 µm, sa distance avec l'accès de la masse de 14 µm : la même que le capteur présenté dans le Chapitre 2 de façon à garder l'adaptation 50 Ω. Des ponts à air sont implémentés pour équilibrer les masses. Le guide d'onde coplanaire présente un gap capacitif de 10 µm de largeur au centre de la structure. L'entité biologique testée est localisée juste au-dessus de cet espace de détection, dans un canal fluidique, et bloquée par la forme en entonnoir.

Le piège est conçu avec trois canaux contre le substrat : un central dont la section est maximale (100 µm de largeur pour 100 µm de hauteur comme représenté sur la Figure 7 b) de façon à avoir le flux maximal au centre pour guider l'objet parfaitement au-dessus de l'espace de détection ; et deux latéraux de section plus petite (50 µm de largeur pour 100 µm de hauteur) permettant de maintenir un flux constant dans le dispositif.

Pour le reste de la structure fluidique, elle forme des entonnoirs en haut et en bas de la structure RF de la même façon que la structure qui avait été utilisée auparavant dans l'équipe, représentée à la Figure 4 (Tong Chen 2012; CHEN 2016). Elle est représentée dans la Figure 7 c. avec les côtes globales qui sont très grandes pour de la micro-fabrication. Par conséquent, le capot, représenté en jaune a besoin de multiples piliers de 300 µm de

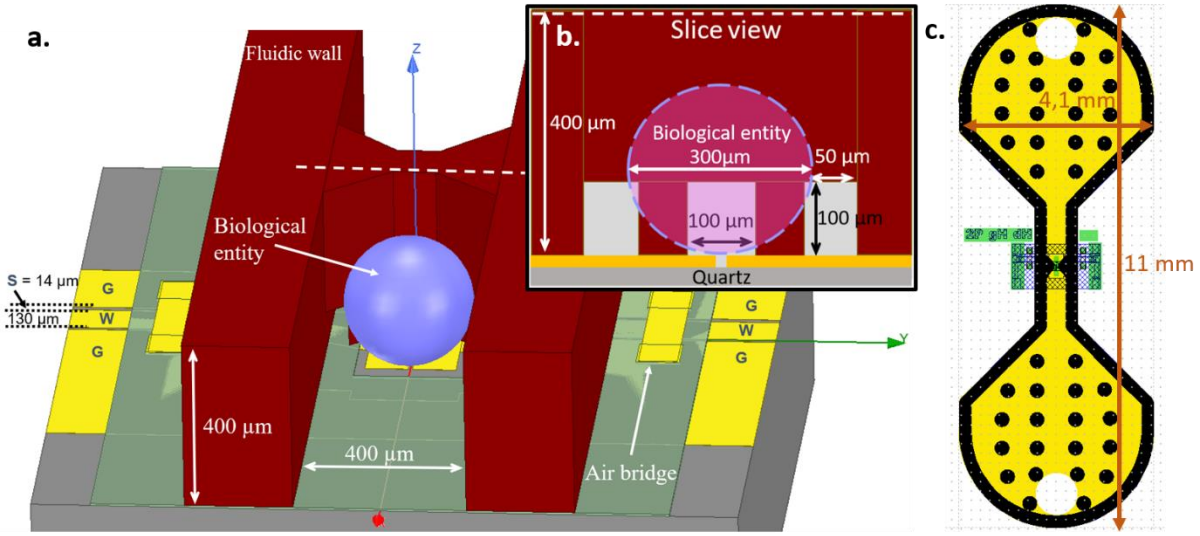


Figure 7 : Schéma descriptif du dispositif RF fluidique avec piège mécanique. a) Vision globale avec toutes les côtes détaillées. b) Vue en coupe au niveau de la ligne en pointillé dans a) de la partie blocage mécanique avec les côtes du canal central de section plus importante que les deux canaux latéraux. c) Schéma de la structure fluidique dans son ensemble.

diamètre, qui seront fabriqué en même temps que les autres étapes (pour avoir des ponts de la même hauteur que les murs fluidiques, donc à la même hauteur que l'attache du capot) afin qu'il ne s'effondre pas sous son propre poids (espacé d'un maximum de 500 µm).

4.2.2 Processus de fabrication

La filière technologique comporte 6 étapes de photolithographie, comme présenté dans la Figure 8, dont 2 étapes de métallisation par la méthode de lift off.

Pour rappel, une métallisation réalisée par lift off nécessite une première étape de photolithographie avec une résine particulière appelée AZ NLOF négative (c'est-à-dire que la polymérisation est déclenchée par l'insolation de rayonnement UV) qui permet d'obtenir des flancs de résine inversés, comme on le voit sur la Figure 8 b) et e). Cette résine sert à protéger toutes les zones de la plaquette qui ne doivent pas être recouvertes de métal. La métallisation de Titane/Or (50nm/300nm) est réalisée par évaporation à dépôt lent de la salle blanche du LAAS et est déposée sur la totalité de la plaquette. Le titane est utilisé pour faciliter l'adhérence de l'or au verre (Chew et al. 2009). Enfin, après avoir obtenu une plaquette recouverte d'or mais possédant la résine NLOF là où le métal n'est pas voué à rester, il suffit de plonger la plaquette dans un bain d'acétone pour dissoudre la résine NLOF et donc enlever le métal non souhaité, d'où le nom de lift off.

Cette méthode est la première étape de photolithographie de cette filière technologique après le nettoyage des plaquettes par un mélange piranha (50/50v d'acide sulfurique pur H_2SO_4, et de de peroxyde d'hydrogène H_2O_2) et un plasma 0_2 de 800W pendant 15min. Une résine NLOF de 2,5µm d'épaisseur est alors utilisée et recouverte d'une métallisation, comme décrit précédemment. Le lift off dure typiquement 50min (voir Figure 8 a), b) et c)). Après avoir obtenue le circuit planaire, une résine SU8 de 5µm est déposée par tournette et photolithographiée pour ne laisser accessible que les accès métalliques pour le contact des pointes RF, comme le montre le schéma de la Figure 8 d. Ensuite une deuxième métallisation est réalisée avec le procédé lift off afin de former des ponts à air (permettant d'équilibrer les masses coplanaires). Cette étape représentée sur la Figure 8 e. et f. a été optimisée de façon à obtenir un lift off d'uniquement 1h30 grâce à une déposition par Spray de la NLOF – 5 µm, associée à des paramètres d'insolation permettant des flans inversés propres.

Une fois la partie RF terminée, le reste des étapes permette de former la partie fluidique de la structure grâce à l'utilisation de films secs (Dry Films = DF). En effet, cette technologie basée sur la lamination de films sur plaquettes permet de réaliser de la micro-fluidique de façon rapide (temps de recuit bien inférieurs à ceux de la résine SU-8 plus classique) et robuste (meilleur rendement de fabrication en comparaison à une technologique SU-8). De plus, elle est bien maitrisée au sein du laboratoire (Courson et al. 2014; Bourrier et al. 2014; Stephan et al. 2007; Bruch et al. 2017). La première étape consiste en la formation du bas du piège fluidique, ainsi que les murs fluidiques avec une première couche de DF de 100 µm d'épaisseur (cf Figure 8 g.). Elle a demandé une optimisation de la température de lamination (100°C), de la vitesse de lamination (1u/min) et de la pression utilisée (2.5bar) pour

obtenir une bonne adhérence de la couche sur la SU8 sans provoquer des défauts dans le reste de la structure. L'étape suivante, d'une épaisseur de 300 µm de DF consiste à la réalisation du capot du piège ainsi que les murs fluidiques comme représenté sur la Figure 8 h. Les paramètres de cette lamination ont été calqués sur ceux déjà développés au sein du laboratoire. De même pour la dernière étape consistant au capotage de la structure avec une épaisseur de DF de 100 µm (représenté à la Figure 8 i.).

La deuxième étape consiste en la fabrication d'une épaisseur de 300 µm, comme indiqué à la Figure 8h., par le dépôt simultané de trois films de 100 µm chacun (ce qui peut se voir sur les photos MEB de la Figure 10). Les paramètres développés pour des applications de capot (ici le capot du piège fluidique) avaient été développés avant par R. Courson (Courson et al. 2014). La dernière étape consiste à réaliser le capot final de la structure par une épaisseur de DF de 100 µm, épaisseur optimisée pour qu'elle ne flue ni ne plie dans le canal fluidique du fait d'une épaisseur trop fine ou en raison d'un poids trop important.

Ce procédé a impliqué différentes optimisations technologiques, notamment vis à vis des métallisations et des couches constituant le canal et bloqueur fluidique.

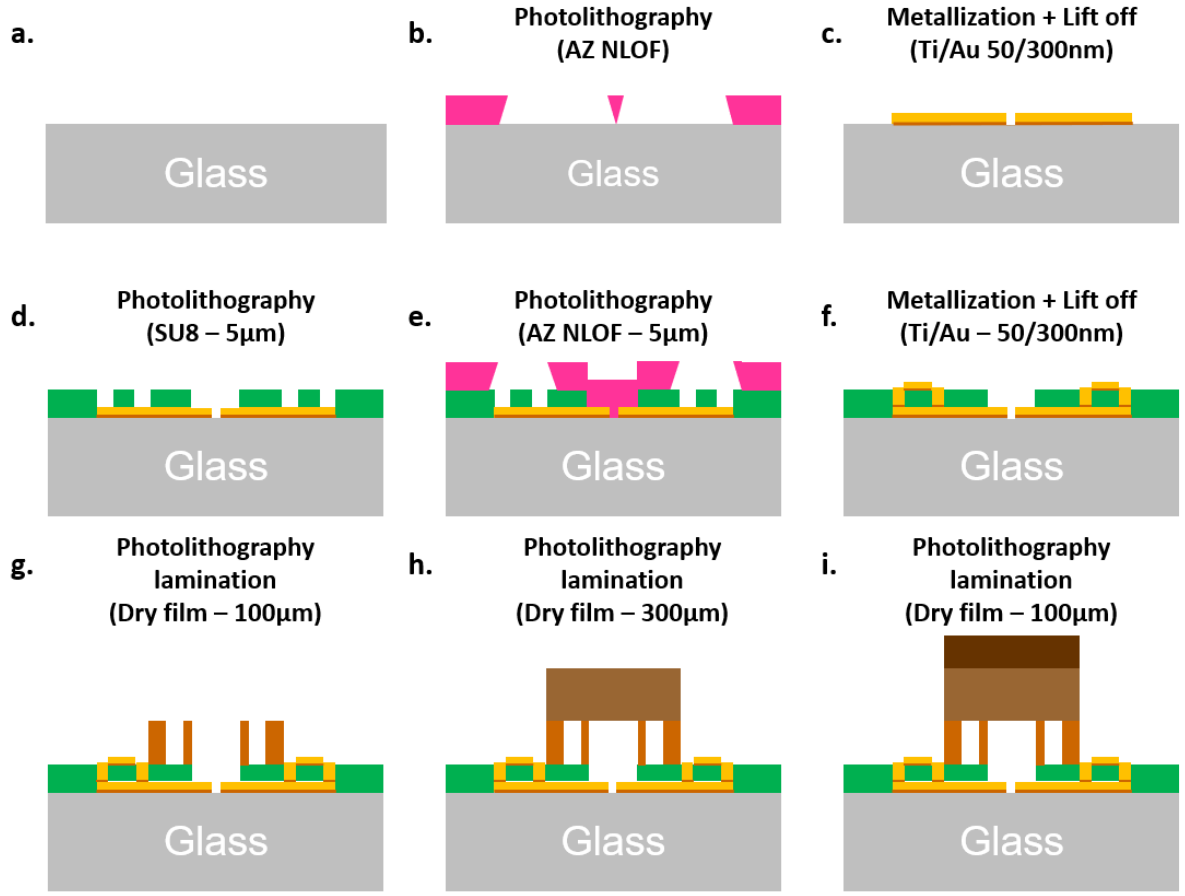


Figure 8 : Etapes de micro-fabrication du dispositif fluidique avec piège mécanique. a) La plaquette support est représentée en gris. b) La résine NLOF est représentée en rose. c) La métallisation possède une épaisseur d'or en jaune de 300nm avec un flash de titane dessous en marron clair de 50nm. d) Passivation du dispositif avec de la SU8 représentée en vert. e) Deuxième NLOF en vue de la métallisation des ponts à air (étape f). Enfin les étapes g) h) et i) permettant la création du dispositif fluidique par lamination de différentes couches de Dry Films (respectivement de 100µm, 300µm et 100µm).

4.2.3 Optimisations technologiques

4.2.3.1 La première métallisation

Elle est réalisée grâce à la méthode de lift off. Ici nous utilisons une AZ NLOF de 2,5 µm dont les paramètres initiaux provoquaient de nombreux restes de résines sur les plaquettes après lift off. Ainsi certains paramètres de fabrication ont été testés afin d'optimiser la résolution mais surtout les flancs inversés permettant que le lift-off soit le plus rapide et le plus efficace possible. Ces paramètres, comprenant le recuit avant insolation, le temps d'insolation (sachant que la lampe utilisée présente une puissance de 25 mW) et enfin le temps de post-recuit, sont présentés dans le Tableau 2.

Tableau 2 : Paramètres testés pour la photolithographie de la NLOF 1.

Paramètres	*W0146*	*W0147*	*W0148*	*W0149*
Recuit 105°C	60s	2min	60s	2min
Insolation	2,5s	2,5s	4s	4s
Recuit post-insolation 110°C	60s	2min	2min	60s

D'abord il est important de noter que, pour une épaisseur de NLOF de 2.5 µm, il est difficile d'observer les flans inversés au microscope malgré des paramètres adaptés. Ainsi le jugement sur les meilleurs paramètres à garder s'est fait à la fois sur leur observation mais aussi sur l'adhérence de l'or, le temps nécessaire pour le lift off, si la NLOF s'est bien entièrement enlevée en fin de procédé notamment.

Le paramètre qui a eu la plus grosse influence sur les flancs inversés fut le temps d'insolation. En effet, à 4s d'insolation de nombreuses aberrations chromatiques apparaissaient, justifiant de flancs inversés très mal contrôlés. Par conséquent, le paramètre qui a été choisi fût 2.5s d'insolation, correspondant à une dose de 62.5 mJ/cm².

Le lift off se réalise normalement en déposant la plaquette dans un bain d'acétone sous agitation (et si l'échantillon n'est pas trop fragile des ultrasons à 130kHz peuvent être utilisés). Ce bain est à changer régulièrement jusqu'à ce que toute la NLOF soit dissoute, en emportant avec elle l'or qui était dessus. Un paramètre qui a permis d'améliorer nettement la propreté des plaquettes en fin de process a été de réaliser un bain de 3min dans du DMSO en fin de lift off. Une fois le maximum enlevé avec de l'acétone, un bain de rinçage dans le DMSO permet de dissoudre les quelques restes de résine et ainsi d'améliorer nettement la propreté des plaquettes.

4.2.3.2 La deuxième métallisation

Comme le paramètre qui avait le plus d'importance sur la première métallisation s'est révélé être l'insolation, pour la deuxième, nous nous sommes concentrés sur ce paramètre et la méthode de dépôt. En effet, la plaquette présente, à ce stade, une épaisseur de 5 µm de

SU8 (en plus de la première métallisation), rendant difficile sa protection avec uniquement une résine NLOF de 5 µm d'épaisseur. Ainsi, le dépôt par spray (qui permet un dépôt conforme) a été testé avec une épaisseur de 5 µm et de 10 µm ainsi que le dépôt par tournette. Les différents paramètres sont rassemblés dans le Tableau 3. Les différents paramètres d'insolation ont été testés par quart de plaquette afin de réduire la quantité de plaquettes testées. Les flancs inversés de la NLOF des deux plaquettes utilisées pour le dépôt par spray ont été caractérisés par imagerie MEB comme on peut l'observer sur la Figure 9.

Tableau 3 : Paramètres testés pour la deuxième métallisation

Paramètres testés	*Wafer 1*	*Wafer 2*	*Wafer 3*
Epaisseur de la NLOF	5 µm	5 µm	10 µm
Méthode de dépôt	Tournette	Spray Coating	Spray Coating
Temps Recuit	4 min 110°C	4 min 110°C	4 min 110°C
Dose d'insolation (mJ/cm²)	180 / 150 / 92 / 76	80 / 140 / 180 / 240	300 / 440 / 540
Temps Recuit post-insolation	4 min 110°C	4 min 110°C	4 min 110°C

Première conclusion qui ressort de ces tests est très certainement que le dépôt par spray améliore considérablement le temps du lift off : sans spray, le lift off requière 2h30, alors qu'avec spray ce temps est réduit à 1h30 maximum. Ensuite la dose d'insolation a aussi son importance notamment sur la forme des flancs inversés, mais aussi leur « solidité » et donc leur capacité à supporter une couche d'or sans s'effondrer : si tel était le cas, le flanc ne serait plus inversé et le solvant ne parviendrait pas à se frayer un chemin et donc à dissoudre la NLOF. Cet argument nous permet de trancher sur l'épaisseur à utiliser de NLOF. En effet comme il est aisément observable sur la Figure 9 que la NLOF 5 µm présente une bien meilleure résolution que la NLOF 10 µm en ce sens que l'angle du carré est formé sur la 5 µm et non sur la 10 µm. La conséquence de cela est que le « plafond » de NLOF va très probablement s'effondrer au moment de la métallisation perdant totalement le flanc inversé.

Enfin, la plus forte dose d'insolation (Figure 9 c.) crée des flancs inversés plus importants que les deux autres (Figure 9 a., la Figure 9 b.) : il s'agit d'une dose trop importante. Enfin, entre le cas de la Figure 9 a. et celui de la Figure 9 b., ce qui permet de trancher est le temps effectif du lift off. En effet, le cas de la Figure 9 b. a permis un lift off plus rapide d'une dizaine de minute que le cas de la Figure 9 c. : c'est donc la dose de 180 mJ/cm² qui sera conservée pour la filière technologique optimisée.

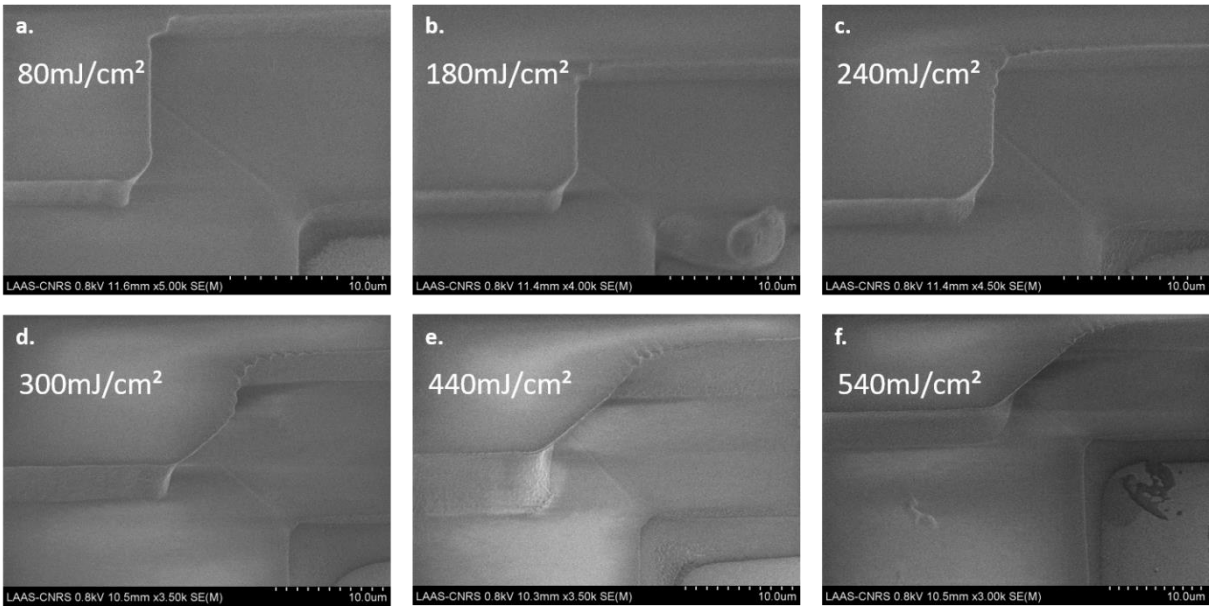


Figure 9 : Caractérisation par MEB des différentes doses d'insolation et de l'épaisseur de la NLOF sur les flancs inversés. a), b) et c) photos de la NLOF de 5µm d'épaisseur et d), e) et f) de la NLOF de 10 µm d'épaisseur avec la dose respective indiquée sur chacune des photos.

4.2.3.3 Les différentes étapes de film sec DF

Comme précisé précédemment, la plupart des paramètres d'utilisation des films secs ont été développés au laboratoire avant le début de ces travaux de thèse. En conséquence, mise à part un ajustement de la première couche de film sec, peu d'optimisations ont été réalisées pour les suivantes.

La première étape nécessitait en effet de faire adhérer le film sec sur la résine SU8 préalablement présente sur la plaquette. Après le développement de cette résine, il restait des traces qui ne se développaient pas, rendant les dispositifs insuffisamment propres. Ainsi nous avons décidé de faire quelques tests pour améliorer la situation. Les paramètres testés sont rassemblés dans le Tableau 4, sachant que le maximum de la température atteignable par la lamineuse était de 130°C, avec un maximum de pression à 2.5 bar et une vitesse minimale de 0.3 u/min.

Tableau 4 : Paramètres d'optimisation du DF 1.

Paramètres	*Départ*	*Plaquette 1*	*Plaquette 2*	*Plaquette 3*
Température	130 °C	130°C	130°C	100°C
Pression	2.5 bar	2.5 bar	2 bar	2.5 bar
Vitesse de lamination	0.3 u/min	1 u/min	0.3 u/min	0.3 u/min

La plaquette 1 présente un mauvais développement, tandis que la plaquette 2 a une partie du piège fluidique qui n'a pas adhéré. Enfin, la plaquette 3 présente moins de restes de

résine après développement. De façon très clair, il fallait donc diminuer la température de lamination pour améliorer la propreté des dispositifs sur cette première étape de DF.

4.2.3.4 Optimisation du canal fluidique

La première version du dispositif fluidique présentée sur la Figure 7 ; et dans la première partie de la Figure 10 a. avec des images réalisées au Microscope Electronique à Balayage (MEB) ; a permis la mise en place et l'optimisation de la filière technologique. Cependant, après l'avoir été testée pour réaliser un piège en aspiration fluidique avec une bille de polystyrène, quelques problèmes ont été révélés et ont nécessité l'élaboration d'un nouveau dessin de structure.

Premièrement, le positionnement du piège fluidique n'était pas adéquat car situé juste au-dessus de la coupure capacitive RF. Dans cette configuration, le piège ne permettait pas de bloquer l'objet d'étude sur les électrodes mais bien avant les électrodes, ce qui décalait l'objet à analyser en dehors de la zone de détection RF. Ainsi, avec la nouvelle conception du capteur qui a suivi, cette erreur a été rectifiée, comme le présente la Figure 10 f. et g.

Deuxièmement, les parties en forme d'entonnoir aux deux extrémités du dispositif comportant des piliers pour le maintien du capot étaient un réel handicap à la structure. En effet, cette forme venait d'une thèse précédente (CHEN 2016) qui travaillait alors sur des cellules à piéger dans une suspension cellulaire, et où cette forme était alors indispensable pour cause de limites de résolutions de micro-fabrication. Mais à l'échelle d'un sphéroïde de 300 µm de diamètre il est difficile de faire des suspensions de sphéroïdes dont la concentration serait maîtrisée. De plus le dispositif fabriqué n'aurait jamais pu laisser passer les sphéroïdes « en trop » dans une telle solution par les canaux latéraux. Ces contraintes imposent le positionnement d'un unique sphéroïde à l'entrée du dispositif, qui, ensuite, est entrainé par un flux en aspiration contre le piège mécanique. Dans cette disposition, les multiples piliers présents lors de la première conception sont autant d'obstacles sur la route du sphéroïde entre l'entrée du dispositif et le piège permettant son bon placement sur les électrodes. Il fallait donc trouver une forme de canal fluidique qui soit la plus rectiligne possible.

Dernière contrainte importante, le système fluidique fonctionne en aspiration et doit laisser une entrée à l'air libre pour permettre l'entrée d'un sphéroïde dans la structure. A l'entrée du dispositif fluidique, une « piscine » a été réalisée (cf Figure 10 i.) de façon à avoir une entrée à l'air libre et la possibilité de mettre suffisamment de liquide pour que l'aspiration ait lieu sans ajout manuel de milieu liquide hôte en permanence mais uniquement à des périodes régulières.

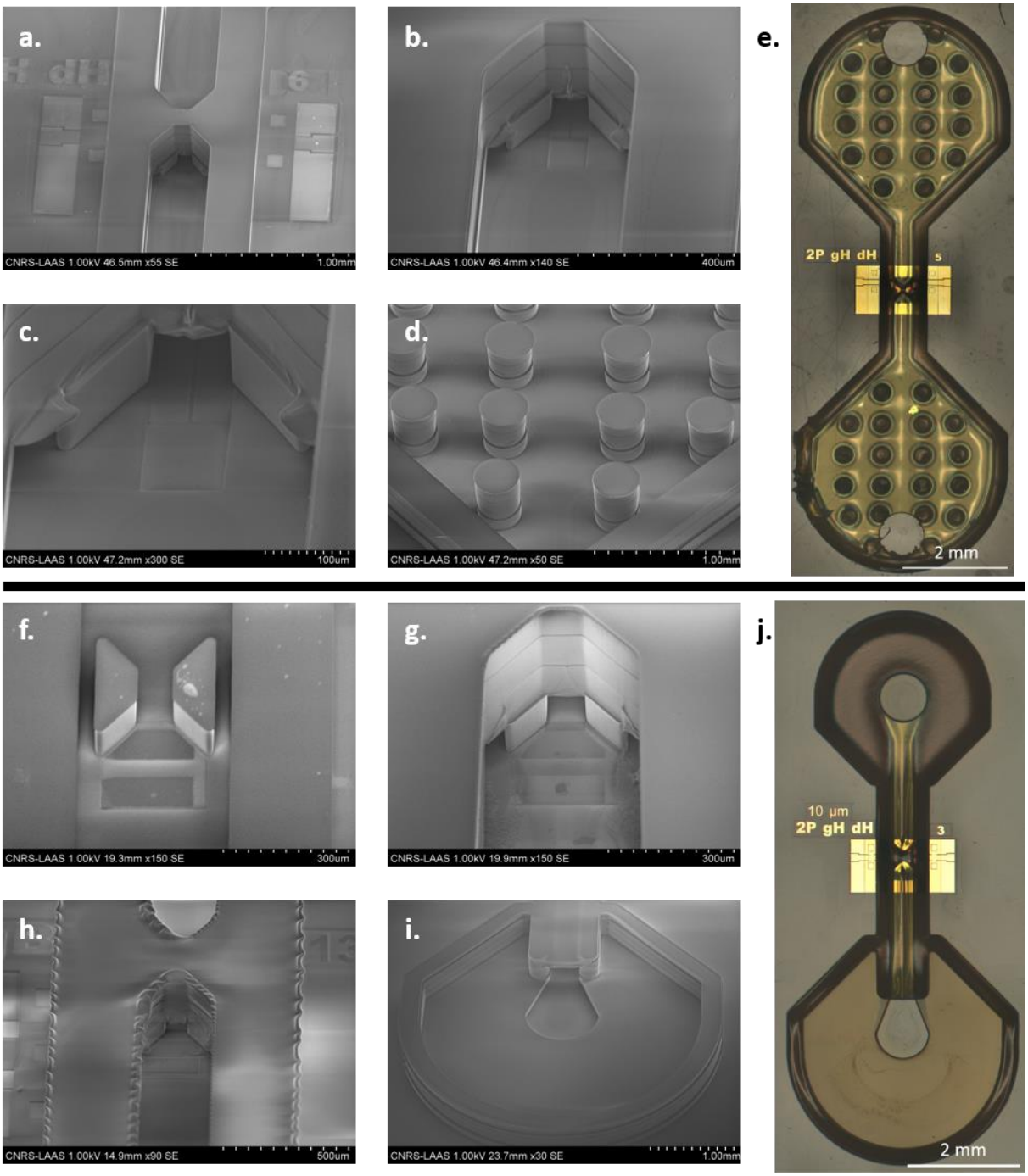


Figure 10 : Photos MEB et schéma de la structure fluidique et du positionnement du piège fluidique. a) Photo MEB d'une structure fluidique globale après l'étape de DF – 300µm. b) Photo MEB zoomée de la photo a) ; et c) zoom de la photo b). d) Photo MEB de l'intérieur de la partie fluidique présentant des piliers pour maintenir le capot global. e) Photo globale du dispositif grâce au microscope HIROX de la structure fabriquée et présentée dans a), b), c), et d). f) Photo MEB du piège fluidique juste après l'étape de DF – 100µm permettant son placement. g) et h) Photo MEB d'une structure vue d'un peu plus loin que f) après l'étape de DF – 300µm. i) Photo MEB post DF – 100µm du capot final de la structure dite de « piscine » visible sur le schéma complet de la structure fluidique dans j). j) Photo globale du dispositif grâce au microscope HIROX de la structure fabriquée et présentée dans f), g), h) et i).

4.3 COMPARAISON DU DISPOSITIF OUVERT/FERME

Comme expliqué dans le Chapitre 2 de cette thèse, le capteur micro-ondes initial présenté dans (Peytral-Rieu, Grenier, et Dubuc 2021) comprend un canal fluidique sans capot, et donc ouvert. Cette configuration entraîne plusieurs inconvénients. Ici est évaluée l'amélioration attendue par une configuration micro-fluidique fermée avec bloqueur mécanique. Comme les principales dispersions du premier capteur ont été détectées avec des billes de polystyrène en raison de leur faible poids dans le liquide, ce modèle est également conservé dans cette étude pour mieux mettre en évidence l'amélioration de la structure fluidique fermée.

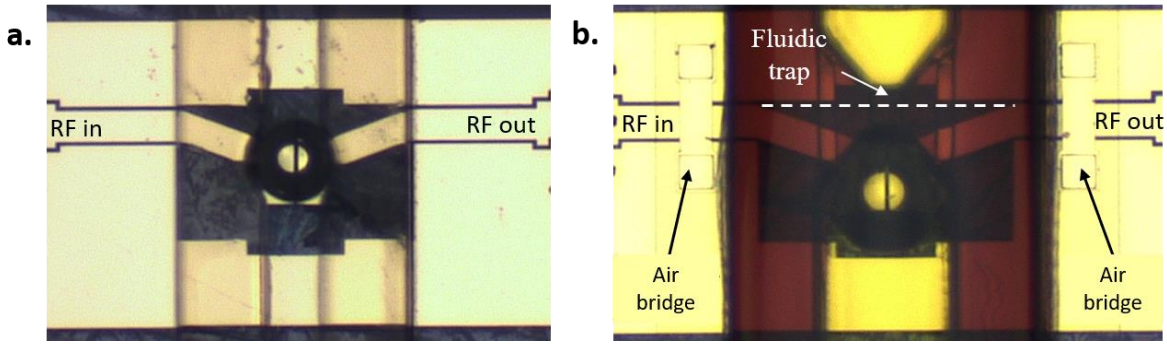


Figure 11 : Photos des deux dispositifs avec une bille de polystyrène dans du PBS pour comparaison. a) Système avec canal fluidique sans capot. b) Dispositif possédant un canal fluidique fermé avec un bloqueur mécanique tel que décrit précédemment.

Pour réaliser cette évaluation, deux billes de polystyrènes dans du PBS sont mesurées dans les deux configurations fluidiques comme le montre la Figure 11. En raison de dispersion de la taille des billes de polystyrène disponibles, celles-ci peuvent présenter des diamètres assez différents (206 et 260 µm de diamètre testé pour le dispositif dit ouvert et 292 et 212 µm de diamètre testé avec le dispositif fermé). Les mesures micro-ondes sont enregistrées toutes les minutes pendant au moins 20 minutes.

Une stabilisation à double régime est observée sur les deux types de dispositifs, ouverts et fermés. Le premier régime est lié à la stabilisation fluidique à l'intérieur du système et dure environ 3 min. Cette première période n'est pas considérée dans la suite de cette étude. Les données extraites se rapportant à 0 minute commencent donc après cette stabilisation. Seulement dans la configuration fluidique ouverte, une deuxième période de mesures est liée aux fluctuations induites par les mouvements des billes dans la structure. De telles variations ne sont pas observées dans la structure fermée. Ainsi, pour pouvoir comparer les deux configurations fluidiques, cette seconde période est divisée en deux étapes (0-5 min et 7-11 min), afin de considérer le temps nécessaire à la mise en place finale des billes dans la structure fluidique ouverte.

Les valeurs moyennes et les écart types des contrastes diélectriques sont calculés pour chaque étape. Les trajectoires entre les deux étapes sont données dans la Figure 12 a), c) et e) pour la structure ouverte et dans la Figure 12 b), d) et f) pour la structure fermée. Comme les graphiques présentent les mêmes échelles, la taille des flèches de trajectoire fournit une

information quantitative des dispersions et de la stabilité des mesures. Cette figure montre clairement que les variations en ΔC et ΔG du système ouvert sont plus importantes que celles obtenues avec le système fermé. ΔG présente en effet une variation supérieure à 0,5 mS en valeur absolue avec la configuration ouverte, alors qu'elle est inférieure à 0,01 mS pour la structure fermée. De même, la variation de ΔC en valeur absolue est supérieure à 3 fF et inférieure à 0,02 fF pour les deux configurations respectives. De plus, le placement des billes sur l'espace de détection est également plus rapide et plus efficace avec le système fermé. En effet, dans le système fermé, le placement de l'objet peut ne prendre qu'une à deux minutes, alors qu'avec le système ouvert il faut au moins cinq minutes pour le placer sur l'espace de détection.

Tableau 5 : Comparaison quantitative entre le système ouvert et le système fermé

	ΔC à 5GHz		ΔG à 20GHz	
	Moyenne	Ecart-type	Moyenne	Ecart-type
PBS ouvert	-1,09	0,57	-0,02	0,06
206 µm ouvert	-65,81	1,60	-10,38	0,22
260 µm ouvert	-65,81	5,61	-10,01	0,78
PBS fermé	-1,14	0,15	-0,04	0,01
292 µm fermé	-60,46	0,21	-5,81	0,02
212 µm fermé	-64,12	0,07	-6,95	0,01

Un résumé de ces résultats est donné dans le Tableau 5 avec les valeurs moyennes et les écarts types de ΔC et ΔG sur une période de 11 minutes. Il confirme la grande stabilité des mesures micro-ondes obtenues avec la structure fluidique fermée par rapport à la structure ouverte. L'écoulement dans le système fermé permet en effet une localisation stable de la bille de polystyrène au fond du piège mécanique, à proximité immédiate des électrodes micro-ondes. De plus, il n'y a plus de phénomène d'évaporation avec la configuration fermée. Il est donc plus adapté à des mesures précises.

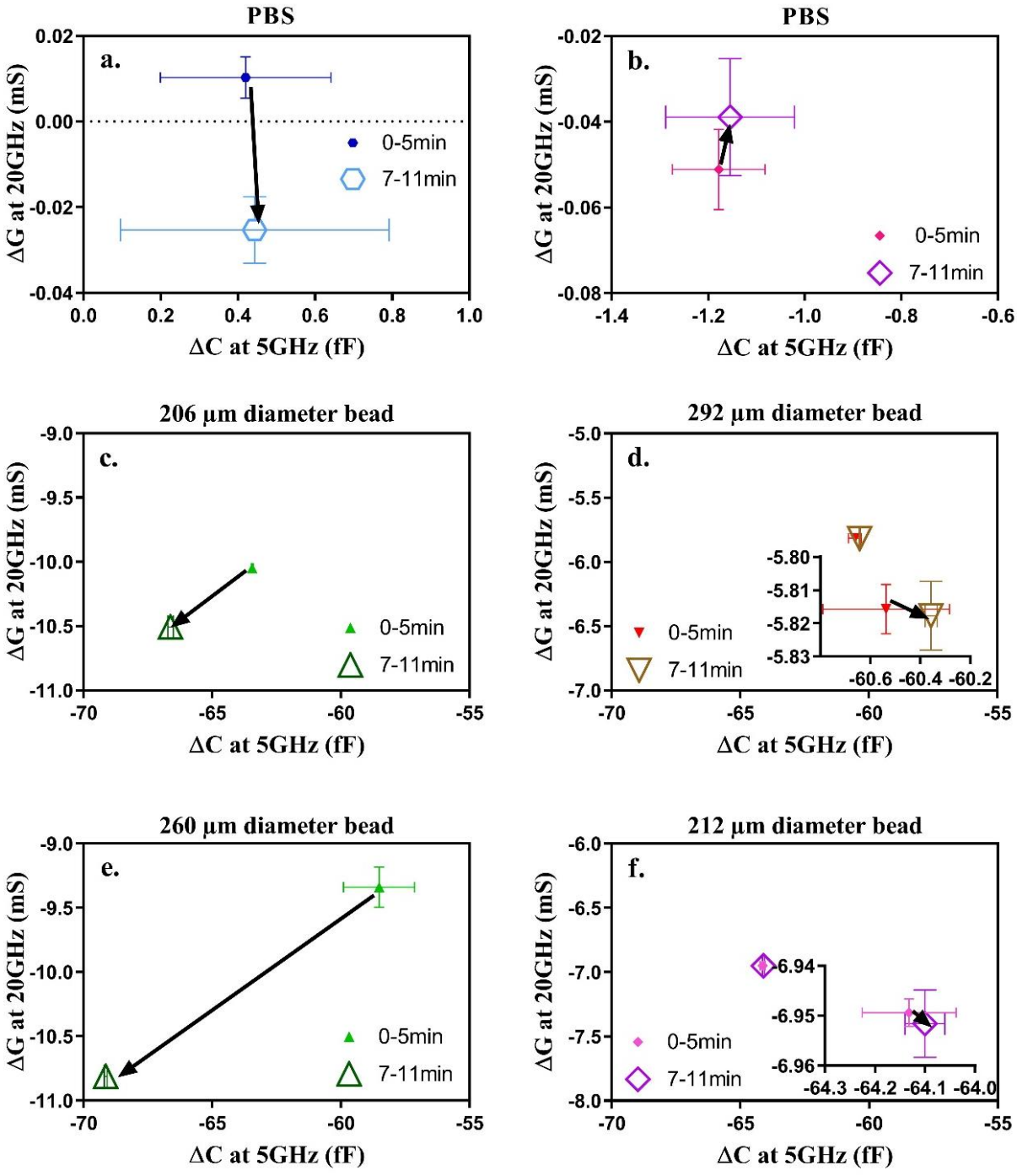


Figure 12 : Comparaison des dispositifs ouvert et fermé par la variation de la mesure au cours d'une période de temps. a), c), e) sont des données obtenues avec le dispositif ouvert, alors que b), d) et f) sont des données obtenues avec le dispositif fermé. a) et b) correspondent tous deux à la mesure de PBS (milieu de référence) au cours du temps. c), d), e) et f) correspondent à des mesures de billes de polystyrène dont le diamètre est écrit en titre de chacun des graphes. Au cours de toutes les mesures, les données ont été sub-divisées suivant deux étapes temporelles équivalentes : 0-5min et 7-11min ; les flèches représentent ainsi la variation de la mesure observée entre ces deux étapes temporelles.

5 PARTIE B : OPTIMISATION DE LA SENSIBILITE DU MICRO-DISPOSITIF RF

5.1 INFLUENCE DE LA LARGEUR DU GAP CAPACITIF SUR LA MESURE HYPERFREQUENCE

En plus de l'amélioration fluidique, une étude analytique du biocapteur est réalisée pour améliorer sa sensibilité. Une étude précédente réalisée sur un biocapteur à micro-ondes dédié à l'analyse de cellules individuelles (W. Chen, Dubuc, et Grenier 2015) a déjà démontré l'influence de la largeur de l'espace entre les deux électrodes qui forment la capacité de détection (on nommera cet espace « gap » dans le reste du manuscrit) sur la sensibilité du capteur. Ainsi, pour étudier une cellule de 10 µm de diamètre, une structure avec un gap de 2 µm de largeur présente la plus grande sensibilité. Dans notre cas, le dispositif présenté vise à étudier des objets biologiques 3D dont le diamètre est proche de 300 µm. Une étude analytique relative à l'impact sur la sensibilité de la largeur du gap est donc menée afin de déterminer la valeur optimale pour atteindre les contrastes diélectriques maximaux. Des conditions d'étude modèles sont initialement définies.

5.1.1 Choix de l'objet modèle et du milieu hôte pour cette étude

L'objet modèle, qui est choisi pour évaluer l'influence de la largeur du gap sur la sensibilité, correspond à des billes de polystyrène d'un diamètre proche de 300 µm. Elles sont en effet plus faciles à manipuler que les micro-tissus lors des mesures micro-ondes réalisées pour valider l'étude analytique. Elles présentent de plus une forme sphérique quasi parfaite, ce qui est simple à implémenter dans un logiciel électromagnétique. Enfin, en raison de la faible permittivité du polystyrène par rapport aux entités biologiques à base d'eau, de forts contrastes diélectriques sont attendus. Les micro-tissus, qui correspondent à des agrégats de cellules et donc à des constituants similaires à ceux présents dans le milieu hôte, présentent en effet de faibles contrastes diélectriques par rapport au fluide de référence (contrastes qui sont de plus, non répétables d'un micro-tissus à l'autre). Pour terminer, nous avons choisi un milieu hôte correspondant au milieu tampon Phosphate Buffer Saline (PBS), ceci afin de garder le même protocole de préparation fluidique du dispositif entre situation modèle (avec bille de polystyrènes et réelles, avec micro-tissus fixés).

5.1.2 Simulations électromagnétiques

Pour évaluer l'influence de la largeur du gap sur la sensibilité du dispositif, des simulations 3D utilisant HFSS sont réalisées à différentes fréquences (1 GHz, 5 GHz, 10 GHz, 15 GHz et 20 GHz). Le schéma de la structure simulée est donné dans la Figure 13 a). Dans la Figure 13 b) sont représentés les différents écarts testés. Les valeurs de permittivité des différents éléments utilisés pour les simulations sont listées dans le Tableau 6 pour la fréquence de 5

GHz et initialement donnée dans (T Chen et al. 2013; Ebberg et al. 2014; Ghalichechian 2015; Grenier et al. 2009). Dans un premier temps, la simulation HFSS donne les paramètres S théoriques du dispositif chargé uniquement avec le fluide de référence (S_{REF}) : ce qui permet d'obtenir la capacitance et la conductance théorique du fluide de référence en appliquant les mêmes calculs décrits dans le Chapitre 2, partie 3 (C_{REF} et G_{REF} respectivement). Dans une deuxième phase, la simulation prédit les paramètres S du dispositif chargé avec la bille de polystyrène dans le fluide de référence (S_{DUT}) pour obtenir la capacitance et la conductance du dispositif (ici la bille) testé (C_{DUT} et G_{DUT} respectivement). Enfin, le contraste est déduit de ces différentes valeurs théoriques permettant d'obtenir ΔC et ΔG pour les différentes valeurs de largeur de gap et les différentes fréquences choisies grâce au même code Matlab utilisé pour l'analyse des données expérimentales.

Tableau 6 : Valeurs de permittivité utilisées dans les simulations.

Permittivité relative à 5 GHz	Tangente de perte diélectrique à 5 GHz	Représentations
5,1	0	Permittivité des plaquettes AF32 (Ebberg et al. 2014)
3	0	Permittivité des billes de polystyrènes (T Chen et al. 2013)
3,201	0,015	Permittivité de la SU8 (Ghalichechian 2015)
81,84	0,496	Permittivité du milieu déterminé expérimentalement (Grenier et al. 2009)

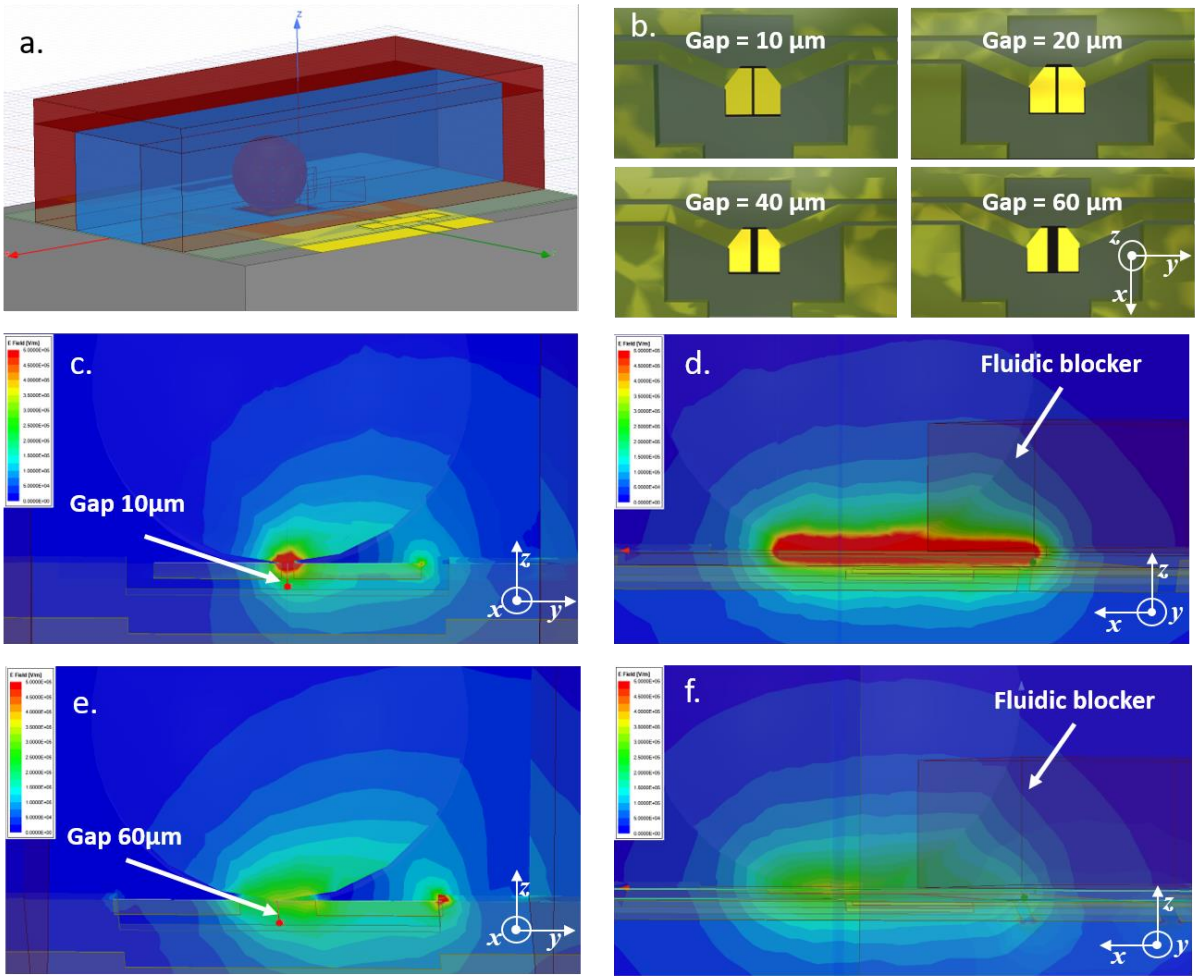


Figure 13 : Simulation HFSS permettant l'étude de la largeur du gap sur le module du champ électrique E. a) Schéma HFSS du dispositif utilisé pour la simulation. b) les différents gaps qui ont été testés expérimentalement et en simulation. c), d), e), et f) Représentation du module du champ électrique E pour deux largeurs différentes de gaps et de deux plans de coupe différentes à 5 GHz. c) et d) étant les résultats pour la largeur de gap = 10µm, respectivement selon les représentations Oyz et Oxz. e) et f) étant les résultats pour la largeur de gap = 60µm selon les représentations Oyz et Oxz respectivement.

Les résultats des simulations sont présentés en pointillés sur la Figure 14 pour une bille de 300 µm de diamètre. Les contrastes capacitifs et conductifs en fonction de la fréquence sont représentés sur la partie a) et b) et les contrastes extraits en fonction de la largeur du gap dans la partie c) et d) de la Figure 14 à, respectivement, 5 GHz et 20GHz. Un contraste d'amplitude maximale est observé pour une largeur de gap de 10 µm. La question de la raison d'un tel résultat s'est posée et la représentation du module du champ électrique a permis de dégager une explication. En effet, comme nous pouvons le voir sur la Figure 13 c), d), e) et f), le champ électrique maximal (au niveau de la sphère modèle) est plus intense dans le cas de la largeur de gap de 10 µm (représenté dans c) et d)) par rapport à la largeur de gap de 60µm (représenté dans e) et f)). Ceci pouvant être expliqué par le fait que lorsque les électrodes sont éloignées, elles interagissent faiblement diminuant la capacitance (et conductance) du capteur et par la même l'intensité du champ électrique dans l'objet étudié (ici la bille de polystyrène). La sensibilité de la détection est alors réduite.

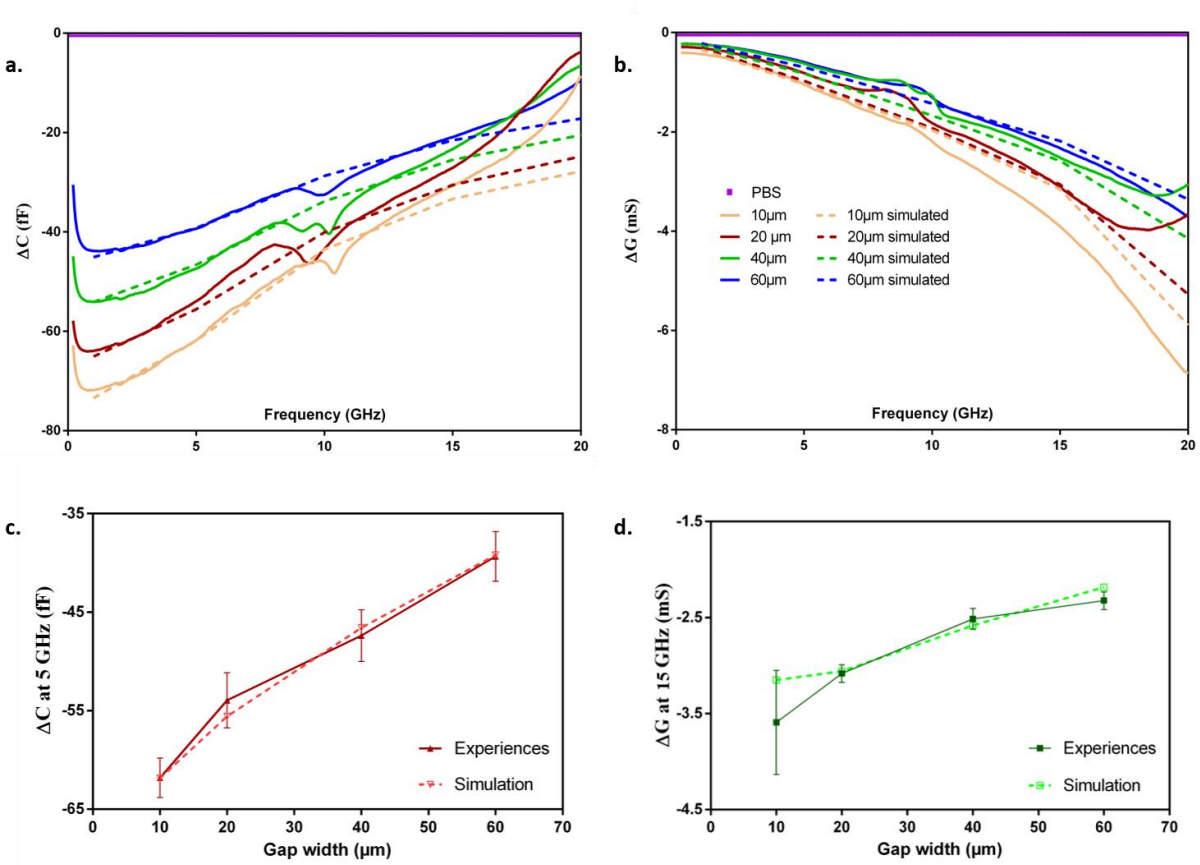


Figure 14 : Résultats de la simulation et des expériences réalisées. a) et b) Représentation, respectivement, du contraste capacitif et du contraste conductif en fonction de la fréquence obtenue expérimentalement en lignes pleines (moyenne de plusieurs mesures de billes de polystyrène représentée) et les données simulées en lignes pointillés. c) Contraste capacitif à 5 GHz en fonction du gap utilisé obtenu expérimentalement et par la simulation. d) Contraste conductif à 20 GHz en fonction du gap utilisé obtenu expérimentalement et par la simulation.

5.1.3 Vérification Expérimentale

L'influence de la largeur du gap sur la sensibilité du dispositif a été testée avec la configuration fluidique fermée. En raison des contraintes de micro-fabrication, des structures avec une largeur de gap égale ou supérieure à 10 µm sont fabriquées et testées, allant de 10 à 60 µm. Tous les dispositifs sont micro-fabriqués sur la même plaquette AF32 en quartz afin de limiter les variations de micro-fabrication d'un lot à l'autre.

Trois billes différentes sont mesurées pour chaque largeur de gap. Pour chaque configuration, une série de mesures est effectuée pendant 15 minutes et les mesures sont faites toutes les minutes. Comme mentionné précédemment dans la partie 4.3 de ce Chapitre, les trois premières minutes ne sont pas considérées pour permettre la stabilisation des mesures. La valeur moyenne et l'écart-type de chaque configuration sont ensuite extraits sur la base des mesures effectuées pendant 12 minutes. Ces résultats sont tous rassemblés dans la Figure 14 en ligne continue. La Figure 14 a) et b) présente la valeur moyenne des contrastes capacitifs et conductifs, ΔC et ΔG respectivement, en fonction de la fréquence. Les écarts-types sont représentés sur la Figure 14 c) et d) pour, respectivement ΔC à 5 GHz et ΔG à 20 GHz. Ces deux fréquences ayant été choisies car correspondant aux valeurs maximales

observées des contrastes (en valeurs absolues). Chaque couleur correspond à une largeur de gap. Comme prévu par les simulations, les amplitudes des contrastes diélectriques diminuent, lorsque la largeur du gap augmente. Les contrastes de plus grande amplitude sont obtenus, en conclusion, pour une largeur de gap de 10 µm, valeur limite que nous nous sommes imposés pour assurer la faisabilité technologique. C'est donc cette valeur optimale que nous avons sélectionné pour les dispositifs utilisés dans la suite de ce manuscrit.

5.2 VALIDATION SUR UN CAS D'ETUDE

Après avoir imaginé et fabriqué le nouveau dispositif optimisé (fluidiquement fermé avec une largeur de gap de 10 µm), nous l'avons comparé avec sa version fluidique ouverte dans la partie précédente, permettant de prouver l'amélioration obtenue sur la stabilité de la mesure RF. A ce stade, avant de réaliser une étude biologique, il était important de vérifier que notre composant permet de mesurer des échantillons biologiques, puisque jusqu'à présent uniquement des billes de polystyrènes avaient été mesurées.

Ainsi, la procédure expérimentale décrite précédemment a été utilisée pour réaliser, dans un premier temps, des mesures de fluides de référence (PBS et milieu de culture sans sérum) pour des fréquences de 0,5 à 20 GHz. Ces mesures, qui sont les références de nos contrastes sont présentés sur la Figure 15 a), b) et c) et sont proche de zéro. Ensuite, grâce au dispositif fluidique optimisé, le blocage de sphéroïdes est très rapide : une minute suffit puisque le sphéroïde est positionné manuellement dans le bassin de la partie inférieure du dispositif à l'aide d'une micropipette de 200 µL. Le débit d'aspiration du milieu hôte est alors suffisant pour attirer le sphéroïde directement sur la zone de détection. Dès lors que le sphéroïde se trouve sur la zone de détection, la première mesure des paramètres S de la structure chargée par le sphéroïde dans son milieu de culture est réalisé, puis chaque minute une mesure est acquise jusqu'à quinze minutes, pour finalement obtenir une valeur moyenne et un écart-type des données sur douze minutes. Comme indiqué précédemment, le temps de stabilisation de trois minutes n'est pas inclus dans l'analyse des données.

Deux conditions extrêmes biologiques ont été testées, à savoir des sphéroïdes fixés et des sphéroïdes vivants (11 et 8 respectivement), représentés dans la Figure 15 sous différentes formes. Les sphéroïdes fixés ont été traités avec du paraformaldéhyde. Il s'agit d'un produit utilisé pour conserver et fixer dans le temps toutes les structures composant une cellule. Il a tendance à faire augmenter le volume des sphéroïdes par rapport à la condition « vivants ». Ainsi, les diamètres des sphéroïdes mesurés étaient de 190 à 460 µm pour les sphéroïdes fixés et de 198 à 268 µm pour ceux vivants. Tous ces sphéroïdes ont été élaborés exactement selon le même protocole détaillé dans le Chapitre 2. Les diamètres ne sont pas représentés sur les figures car aucune corrélation entre la taille du sphéroïde et la signature RF n'a été trouvée à ce stade. Les signatures RF des sphéroïdes fixés paraissent beaucoup plus dispersés pour le contraste capacitif et conductif que pour celles des sphéroïdes vivants, ce qui explique le nombre plus élevé de sphéroïdes fixés testés, afin d'essayer d'observer une tendance.

La Figure 15 est construite en trois parties différentes. La première comporte les contrastes capacitif et conductif des sphéroïdes mesurés en fonction de la fréquence (partie a) et b). La deuxième correspond à la représentation complexe de ces contrastes. Les fréquences ont été choisies vis à vis des contrastes maxima. Les écart-types obtenus durant les 12 minutes de mesure sont également représentés (partie c). Enfin, une analyse statistique pour ces deux mêmes contrastes aux mêmes fréquences sélectionnées est indiquée (partie d) et e). Les fréquences choisies sont celles où le contraste capacitif et conductif est le plus important, soit 2 GHz pour le contraste capacitif et 20 GHz pour le contraste conductif respectivement.

La première conclusion possible est que le dispositif est capable de caractériser en très peu de temps des sphéroïdes, vivants ou fixés et ce avec une très bonne répétabilité de mesure. En revanche, une variabilité existe d'un sphéroïde à l'autre, aussi bien pour les sphéroïdes fixés que pour les vivants, même si elle est plus importante pour les sphéroïdes fixés. Cette dispersion des mesures peut s'expliquer. Bien que le processus de fabrication soit suffisamment standardisé pour obtenir une bonne homogénéité des diamètres des sphéroïdes obtenus, des différences de forme ne peuvent cependant pas être évitées. Certains sont plus ovales que ronds, ce qui peut vraisemblablement avoir une influence sur la mesure RF réalisée. Aussi a-t-il été choisi de faire une analyse statistique de type ANOVA. Ainsi, malgré cette dispersion, le résultat ANOVA obtenu confirme que le capteur permet de différencier significativement les sphéroïdes vivants (en bleu) des sphéroïdes fixés (en vert), et ce avec une valeur de p inférieure à 0.0001 pour les deux contrastes capacitif et conductif.

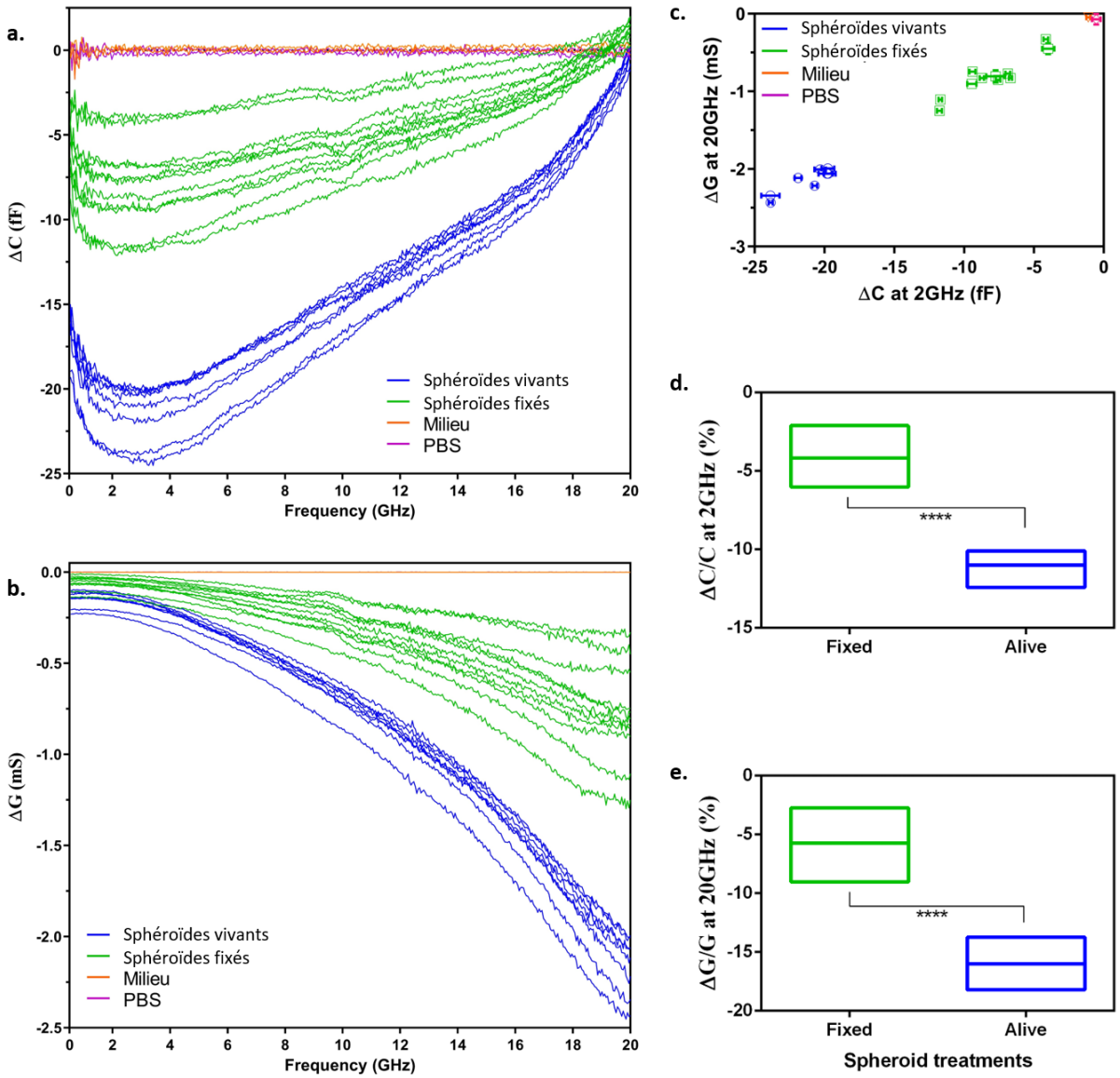


Figure 15 : Validation expérimentale sur un cas d'étude de sphéroïdes vivants VS sphéroïdes fixés. a) et b) représentent, respectivement, les contrastes capacitif et conductif en fonction de la fréquence. Chaque trait correspond à la signature RF d'un sphéroïde, en bleu les sphéroïdes vivants, en vert les sphéroïdes fixés, en orange le PBS seul et en rose le milieu de culture seul. c) Représentation dans le plan complexe des résultats a) et b) : contraste conductif à 20GHz en fonction du contraste capacitif à 5GHz. d) et e) résultats d'analyse ANOVA sur les deux types de sphéroïdes (vivants et fixés), respectivement pour la sensibilité calculée à partir de la capacitance $\left({}^{\Delta C}/_{C}\right)$ *et celle calculée à partir de la conductance* $\left({}^{\Delta G}/_{G}\right)$. $**** = \ p < 0.0001$.

6 CONCLUSIONS

L'état de l'art des pièges fluidiques associés à la synthèse de ceux-ci appliqué aux dispositifs RF a permis de montrer que les méthodes les plus utilisés dans l'analyse d'objet unique sont les pièges mécaniques. En effet, ils représentent un bon compromis entre le contrôle du positionnement de l'objet étudiés et les contraintes RF, comme par exemple le fait que la structure fluidique ne soit pas trop importante pour ne pas augmenter les pertes qui leurs sont associées.

Basé sur cet état de l'art et les précédents travaux réalisés dans l'équipe à l'échelle de la cellule unique un bloqueur mécanique fluidique pour microtissus de 300 µm de diamètre a été imaginé. Il a ensuite été testé grâce à des structures en PDMS permettant de prouver son efficacité et donc de valider sa structure. Cependant le PDMS a besoin d'une grande surface pour adhérer au verre, le support utilisé pour les structures RF. IL fallait donc de la microfabrication pour ne plus avoir ses problèmes d'adhérence.

Une filière technologique de huit étapes a été entièrement développée, décrite et optimisée de façon à obtenir un dispositif optimisé sur le plan fluidique. Ce dispositif a ensuite été comparé avec le dispositif fluidique du Chapitre 2 afin d'en mesurer les améliorations quantitativement dans le cadre de l'étude d'une bille de polystyrène (objet avec lequel la variation du dispositif fluidique ouvert était maximale). La stabilité de la mesure est sans nulle doute améliorée avec la nouvelle structure par rapport à l'ancienne.

Il restait cependant une question sur la valeur de la largeur du gap utilisé sur le dispositif RF. L'analyse par simulation électromagnétique et l'analyse expérimentale a permis de montrer que lorsque la largeur du gap augmente de 10 µm à 60 µm, la sensibilité du capteur diminue. Les simulations nous ont permis de dégager une explication : lorsque les électrodes sont éloignées, elles interagissent faiblement, réduisant la capacitance (et la conductance) du capteur et par la même l'intensité du champ électrique dans l'objet étudié. La sensibilité du capteur est donc diminuée. L'étude n'a pas été réalisée pour des valeurs inférieures à 10 µm pour des raisons de faisabilité technologique : c'est donc la valeur qui a été conservée pour le reste des dispositifs.

Enfin une validation du dispositif fluidique optimisé avec une largeur de gap de 10 µm a été réalisée grâce à des sphéroïdes vivants et d'autres fixés avec du paraformaldéhyde. Le dispositif permet : de piéger l'objet biologique très rapidement, d'en faire la mesure sur 15 min avec une bonne répétabilité de la mesure ; et il permet de discriminer très clairement des sphéroïdes vivants de sphéroïdes fixés. Ces résultats sont très prometteurs sur les potentielles capacités de ce nouveau dispositif pour l'analyse de micro-tissu par spectroscopie diélectrique microondes, notamment vis-à-vis de criblages de molécules et de mesures en temps réel.

Chapitre 4

Chapitre 4 : Démonstration des capacités du micro-dispositif RF en cancérologie

1 INTRODUCTION 118

2 UTILISATION DE LA TECHNOLOGIE LUCS POUR LA DETERMINATION DES CONCENTRATIONS A UTILISER 120

2.1 Description de la méthode LUCS développée par l'entreprise AOP 120

2.2 Optimisation de la méthode LUCS pour une utilisation sur sphéroïdes 122

2.3 Détermination de doses réponses de différents agents chimiques 124

3 MESURE D'ETAT BIOLOGIQUE STATIQUE 127

3.1 Protocole 127

3.2 Résultats & Discussions 127

4 SUIVI EN TEMPS REEL DE REPONSES BIOLOGIQUES 131

4.1 Protocole 131

4.2 Résultats & Discussions 133

5 CONCLUSIONS 137

1 INTRODUCTION

Nous avons vu au cours de ce manuscrit qu'un besoin existait dans le développement de nouvelles approches permettant d'étudier les sphéroïdes par des méthodes non invasives, non destructives et sans marquage préalable. Nous avons ensuite décrit le premier dispositif sur lequel ces travaux de thèse ont débuté avec le développement de la modélisation utilisée pour extraire des données brutes expérimentales, la capacitance et la conductance de l'objet étudié. L'évaluation du dispositif fluidique ouvert a ainsi démontré ses limites, qui ont été caractérisées. Un nouveau dispositif fluidique a donc été développé pour pallier ce défaut et une amélioration de la sensibilité de la structure RF a de plus été réalisée. Ce chapitre exploite l'aboutissement du dispositif comportant une structure fluidique et une structure RF optimisées pour des analyses biologiques.

Pour ce faire trois agents chimiques cytotoxiques sur la lignée cellulaire utilisée ont été choisis pour démontrer la possibilité de caractériser électriquement les phénomènes biologiques associés à cette toxicité : Chloroquine, Méthanol et TSA. Cependant avant toute analyse RF, il était important pour nous de déterminer expérimentalement les concentrations à utiliser sur les sphéroïdes fabriqués avec le protocole décrit dans le Chapitre 2. En toxicologie, ce type d'analyse se nomme « détermination de la dose réponse », ou « détermination de relation dose-effet ». Il s'agit de déterminer la manière dont un organisme réagit à une substance toxique quantitativement en fonction de l'exposition totale à cette substance (ex. une petite dose de monoxyde de carbone peut causer un état de somnolence, alors qu'une forte dose peut provoquer la mort). Expérimentalement, ce type d'expérience se traduit par le test d'une série d'une dizaine de concentrations différentes de la molécule d'intérêt et de mesurer un paramètre qui permet de suivre la toxicité progressive. Ensuite, grâce à un traitement analytique de régression non linéaire on obtient une courbe fonction du logarithme de la concentration et il est possible d'en déduire celle dite « efficace médiane » noté EC_{50}. Dans les faits, il s'agit de la quantité à partir de laquelle 50% de la population cellulaire est morte. De la même façon, il est également possible de déterminer à partir de cette courbe l'EC_{90} correspondant à la quantité à partir de laquelle 90% de la population est morte.

Pour déterminer cette valeur d'EC_{50} il a été décidé d'utiliser un test développé par une start up hébergée au laboratoire LAAS-CNRS dans l'équipe de recherche MH2F : le test Light-Up Cell System (LUCS). L'explication du fonctionnement de ce test d'évaluation de la toxicité d'agent chimique proposé, a été inspiré de l'article publié en 2017 par Furger et al. décrivant la découverte et l'optimisation de ce test pour des tests de haut débit dans des plaques 96-puits (Derick et al. 2017). Cependant ce test a été développé pour des cultures cellulaires en deux dimensions dans des flasques, par conséquent son application sur des sphéroïdes a demandé une phase d'optimisation qui sera décrite ici.

Après l'optimisation de LUCS pour des échantillons de types sphéroïdes, cette technique sera utilisée pour déterminer les doses réponses des différents agents chimiques mentionnés plus haut. Les concentrations de travail ainsi déterminées, deux types d'analyses RF seront décrites : d'une part des mesures d'état statique pour lesquelles le traitement aura été réalisé en amont de la mesure RF ; et d'autre part un suivi en temps réel d'un traitement chimique réalisé *in situ* grâce à la structure fluidique optimisée.

Une conclusion clôturera ce chapitre en listant les capacités ainsi démontrées du dispositif fluidique développé au cours de ces travaux de thèse.

2 UTILISATION DE LA TECHNOLOGIE LUCS POUR LA DETERMINATION DES CONCENTRATIONS A UTILISER

2.1 DESCRIPTION DE LA METHODE LUCS DEVELOPPEE PAR L'ENTREPRISE AOP

L'explosion des connaissances en biologie cellulaire au cours des vingt dernières années a conduit à l'intégration des essais sur cellules vivantes dans l'industrie. Une synthèse récente (Furger 2016) a identifié que les tests sur cellules vivantes représentent une nouvelle classe de tests de recherche à vocation industrielle, dont les applications ne cessent de se multiplier (pharmacie, cosmétique, environnement, etc.). En effet, les tests cellulaires se positionnent aujourd'hui comme de nouveaux outils à l'interface entre les méthodes chimiques, souvent obsolètes et peu informatives, et les méthodes utilisant des modèles animaux, qui sont coûteuses, et ne correspondent pas aux données humaines et qui sont largement discutées d'un point de vue éthique. Enfin, le développement des tests cellulaires est actuellement renforcé par leur mise en application réglementaire, notamment en Europe à travers les directives REACH (Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals) et cosmétiques.

L'état d'homéostasie cellulaire est la première information pertinente que l'on peut extraire de cellules vivantes en culture soumises à une condition (c'est-à-dire un médicament candidat, une substance toxique, un stress physique, ...). Le changement d'homéostasie fait référence aux signes d'une attaque cellulaire massive et irréversible conduisant à une mort programmée, appelée apoptose, une nécrose ou à des altérations majeures de la membrane plasmique mais aussi à d'autres événements subtils, éventuellement réversibles, qui modifient le comportement de la cellule (Nurse et Hayles 2011). Les principaux signaux d'homéostasie qui ont été exploités jusqu'à présent dans l'analyse cellulaire sont (i) la respiration cellulaire, mesurée par les niveaux d'ATP ou de NAD(P)H (Schoonen et al. 2005), (ii) l'intégrité de la membrane plasmique (Cho et al. 2008), (iii) les potentiels de la membrane plasmique (González et Maher 2002) ou mitochondriale (Sakamuru, Attene-Ramos, et Xia 2016), (IV) l'activité lysosomale, mesurée par l'activité de la H^+-ATPase (Kull et Cuatrecasas 1983) et (v) le stress oxydatif (Forkink et al. 2015). Les principaux obstacles à leur utilisation dans les applications réglementaires et industrielles sont la complexité de la mise en œuvre des tests et leur incapacité à être standardisés dans des formats à haut débit ou multiplex avec de bonnes valeurs de robustesse. Par conséquent, il est urgent de mettre au point des tests simples pour mesurer l'homéostasie dans des cellules vivantes. Ceci est particulièrement vrai dans le domaine de la réglementation où tous les tests cellulaires adoptés par l'OCDE, principalement dédiés à l'évaluation des risques de toxicité, sont limités dans leur débit et leurs applications (Judson et al. 2013).

L'avenir d'un test innovant sur cellules vivantes repose clairement sur sa capacité à être universel, simple, à haut débit, adapté au multiplexage et mécanistiquement bien compris. Enfin, il doit aussi révéler des informations qui ne sont pas disponibles par d'autres tests.

Une nouvelle méthode d'analyse des cellules vivantes, en culture cellulaire deux dimensions, appelée LUCS a été développée par l'entreprise Anti Oxidant Power (AOP). Elle est basée sur les propriétés induites par la lumière de certains colorants cyanines. Alors que les niveaux de fluorescence des colorants restent faibles dans les cellules saines en raison du transport d'efflux des médicaments (Frey, Yue, et Haugland 1995), l'induction par la lumière déclenche la génération d'espèces oxydatives intracellulaires (Prunkl et al. 2010) qui perturbent l'homéostasie cellulaire, ce qui entraîne une entrée massive du colorant et, par conséquent, une augmentation considérable de la fluorescence. À l'inverse, lorsque les cellules ont subi une perte préalable d'homéostasie, l'induction lumineuse n'a aucune influence sur les niveaux de fluorescence observés. La procédure expérimentale a été optimisée pour une seule addition du colorant dans le milieu de culture, suivie d'un flash lumineux intense. L'état d'homéostasie cellulaire est déduit du rapport entre les niveaux de post et de pré-fluorescence. Le processus a ensuite été standardisé pour des plaques de 96 puits en mesurant les niveaux de fluorescence avant (F_{pre}) et après (F_{post}) l'application de la lumière et en calculant le rapport :

(22) $$R = {F_{post}}/{F_{pre}}$$

Ce qui rend la technique LUCS intéressante, c'est que l'amplitude de l'éclairage varie en fonction de la dose et de l'état d'homéostasie et donc d'altération des cellules. Ceci a été démontré en utilisant des cellules HepG2 incubées pendant 24 h avec de la chloroquine, un médicament antipaludéen connu pour être cytotoxique, à différentes concentrations. Les résultats montrent que le colorant thiazole orange (TO) F_{pre} varie en fonction de la concentration tandis que les valeurs F_{post} restent quasiment inchangées quelle que soit la condition de chloroquine appliquée (Figure 1 a). La concentration d'efficacité de 50 % (EC50) a été évaluée en ajustant les rapports *R* aux courbes dose-réponse sigmoïdes (Figure 1 b).

La capacité de suivre l'intensité lumineuse a prouvé que le test peut analyser des changements subtils dans l'homéostasie cellulaire ce qui le rapproche des essais classiques MTT (ou protocole avancé WST-1) et NRU. En effet, ces deux derniers tests cellulaires mesurent l'homéostasie en relation avec le métabolisme cellulaire, le premier par l'activité des oxydoréductases NAD(P)H-dépendantes cytoplasmiques et mitochondriales (Berridge, Herst, et Tan 2005), le second par l'activité de la pompe à protons ATP-dépendante qui maintient un différentiel de pH lysosomal/cytoplasmique conduisant à un marquage rouge neutre discret (Repetto, del Peso, et Zurita 2008). Cependant, l'étape de lyse cellulaire par le MTT (1 à 4 heures) et la dépendance du NRU à l'analyse d'image limitent la valeur de ces deux approches en termes d'applications multiplex. Le test LUCS contourne ces problèmes grâce à des temps d'incubation courts et des lectures qui permettent de garder les cellules opérationnelles pour des analyses parallèles ou ultérieures.

Cette récente approche LUCS a donc initialement été développée comme un test sur cellules vivantes, en culture cellulaire deux dimensions, pour l'analyse de l'homéostasie de culture cellulaire en surface plane puis, elle est appliquée comme une méthode alternative pour prédire la toxicité orale aiguë humaine (Gironde, Dufour, et Furger 2020) ou, dans une autre configuration, pour mesurer l'effet antioxydant à l'intérieur des cellules (Gironde et al.

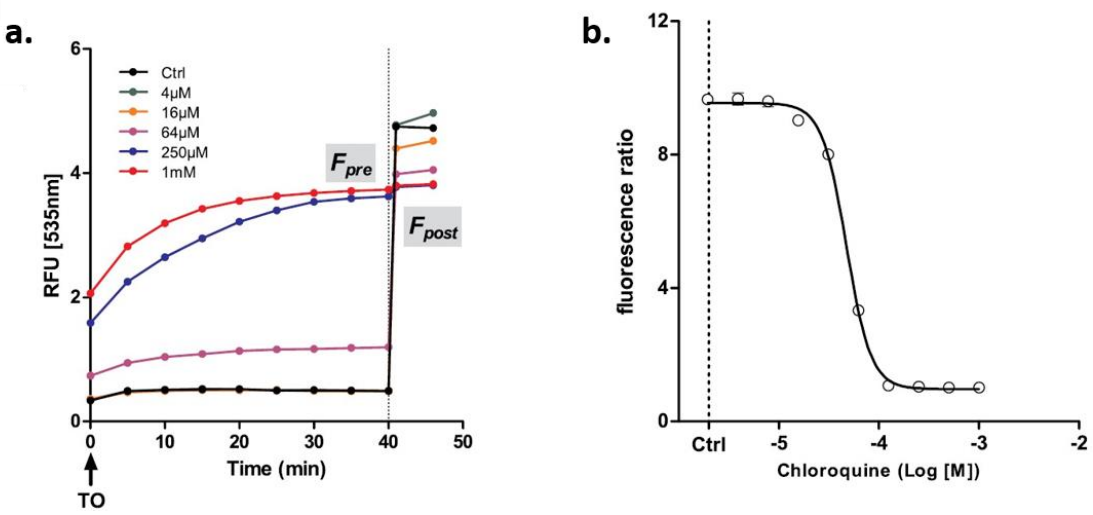


Figure 1 : Expériences de LUCS utilisant le thiazole orange (TO) : a) courbes de fluorescence obtenues après traitement (24 h) à des doses croissantes de chloroquine, T = 0 : ajout de TO 4 µM, T = 40 min, illumination par LED (470 nm, 240 mJ/cm2) ; b) courbe dose-réponse à la chloroquine, mesurée par les rapports de fluorescence LUCS. Les données présentées sont représentatives de 6 expériences. Reproduit avec autorisation de Derick et al. – 2017.

2020). Dans toutes ces configurations, des plaques de 96 puits à fond plat ont été utilisées et la concentration de TO est de 4 µM incubée pendant 40 min. L'intensité de la fluorescence (c'est-à-dire F_{pre}) est mesurée à l'aide d'un lecteur multimode à balayage spectral Varioskan Flash (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Mass., USA) réglé à 505/535 nm (longueurs d'onde d'excitation/émission). Les plaques à puits sont ensuite placées dans un illuminateur dédié (24 LEDs, 470nm, chaque LED centrée sur l'intersection de 4 puits et éclairée à 24 mW/cm² pendant 10s). La fluorescence (F_{post}) a été mesurée une seconde fois immédiatement après l'illumination.

2.2 OPTIMISATION DE LA METHODE LUCS POUR UNE UTILISATION SUR SPHEROÏDES

LUCS permet de déterminer la toxicité de molécules données sur cellules vivantes en culture cellulaire deux dimensions grâce à une mesure d'homéostasie des cellules. Il est bien maitrisé sur cellules de type HepG2 (la lignée choisie ici) dans l'équipe où ces travaux de thèse ont été réalisés et il donne des résultats plus pertinents que des tests commerciaux pas nécessairement maitrisés au sein de l'équipe. Cependant il n'a pas été développé pour des sphéroïdes de 300 µm de diamètre : pour l'utiliser pour déterminer les concentrations de travail que nous utiliserons ensuite, il a fallu l'optimiser pour cette application particulière. Cette optimisation a été réalisée en collaboration avec l'entreprise AOP.

L'application de la technique LUCS sur sphéroïdes demande un peu de réflexion. En effet, en considérant des sphéroïdes de 300 µm de diamètre, la configuration contenant une suspension de sphéroïdes dans chaque puit n'est pas envisageable. Il y a plusieurs raisons à cela. Premièrement, ils ne resteront pas en suspension et se retrouveront au fond du puits. Ensuite, la suspension ne sera pas suffisamment homogène pour obtenir statistiquement le même nombre de sphéroïdes par puits. Il a donc été décidé d'utiliser des plaques de 96 puits

à fond rond avec soit un seul sphéroïde, soit cinq sphéroïdes par puits pour contrôler le nombre et la place du sphéroïde à l'intérieur du puit pour analyse.

Deux paramètres principaux peuvent être modifiés pour optimiser les essais LUCS : la concentration en TO et les paramètres d'illumination. Les concentrations de TO ont d'abord été testées avec la valeur la plus basse, 4 µM (celle actuellement utilisée dans les expériences de culture cellulaire en 2D) jusqu'à 128 µM avec un facteur 2 (4 µM, 8 µM, 16 µM, 32 µM, 64 µM, 128 µM). Dans cette configuration, les paramètres d'illumination des expériences en 2D sont utilisés. Les résultats sont présentés dans la Figure 2 (a). Le paramètre R qui est mesuré étant obtenu avec les intensités de fluorescence avant et après illumination, un rapport de 100 signifie qu'il n'y a pas de différence entre les deux états précédemment cités. La concentration du TO doit permettre d'obtenir le plus grand rapport pour obtenir la sensibilité maximale du test LUCS. Les deux meilleures concentrations de TO obtenues sont donc de 8 et 16 µM. Pour ces deux concentrations, une preuve de concept a ensuite été réalisée pour vérifier si la cytotoxicité de la Chloroquine pouvait être déterminée par LUCS sur des sphéroïdes, en discriminant deux concentrations extrêmes (2 mM de Chloroquine et le contrôle). Les résultats sont présentés dans la Figure 2 (b). Il y a une différence significative

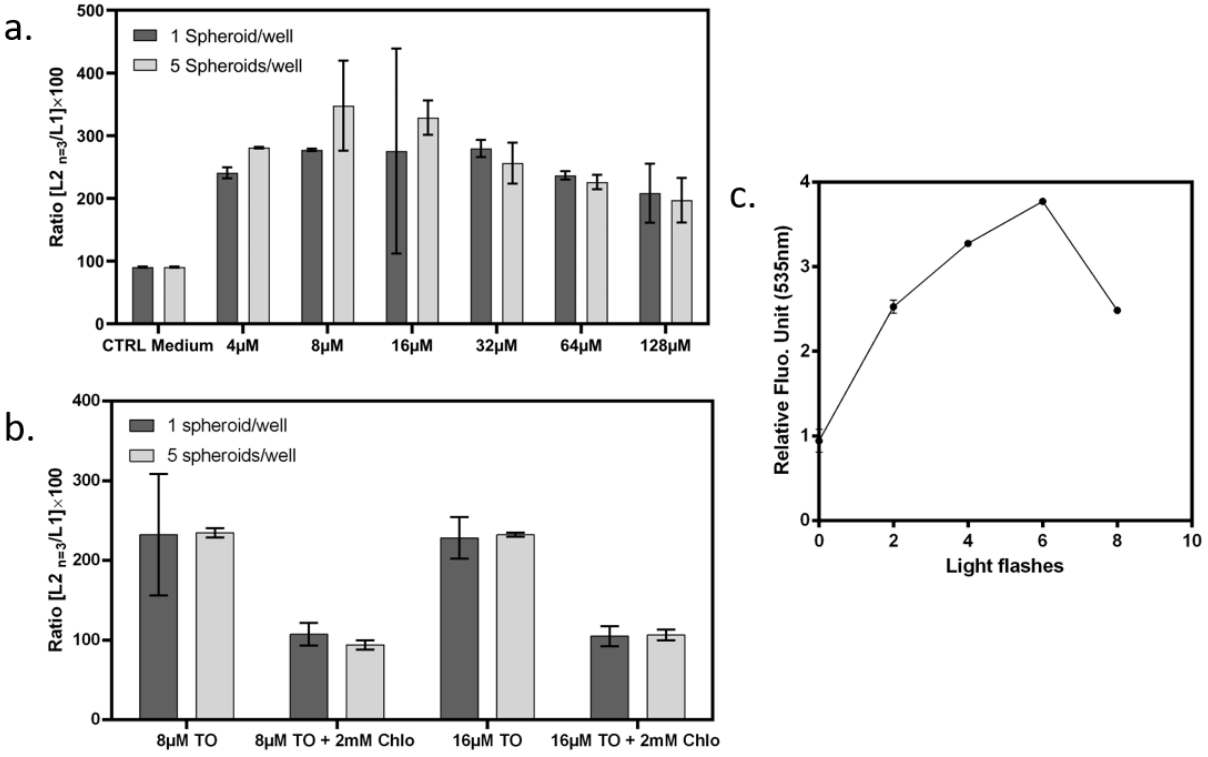


Figure 2 : Optimisation du LUCS pour les essais sur les sphéroïdes. (a) Test de concentration de TO pour obtenir le plus grand ratio avec les paramètres d'illumination utilisés avec les expériences sur cellules 2D. Deux cas différents ont été testés : avec un seul sphéroïde par puits sur des plaques de 96 puits, ou cinq sphéroïdes par puits. (b) Preuve de concept du test de la Chloroquine sur des sphéroïdes grâce aux tests LUCS. Les deux meilleures concentrations de TO ont été utilisées et un test négatif et positif ont été réalisés. La Chloroquine (Chlo dans le graphique) a été testée à 2 mM comme concentration cytotoxique et comparée aux sphéroïdes de contrôle. Le ratio obtenu est deux fois plus important sur l'expérience témoin que sur celle de la Chlo. (c) Optimisation des paramètres d'illumination : nombre de flashs lumineux nécessaires pour obtenir la fluorescence maximale avec la concentration de TO à 8µM. Un flash lumineux correspondant à une illumination par LED à 470nm, 24mW.cm-2 pendant 10s : le paramètre utilisé pour le LUCS sur culture cellulaire 2D.

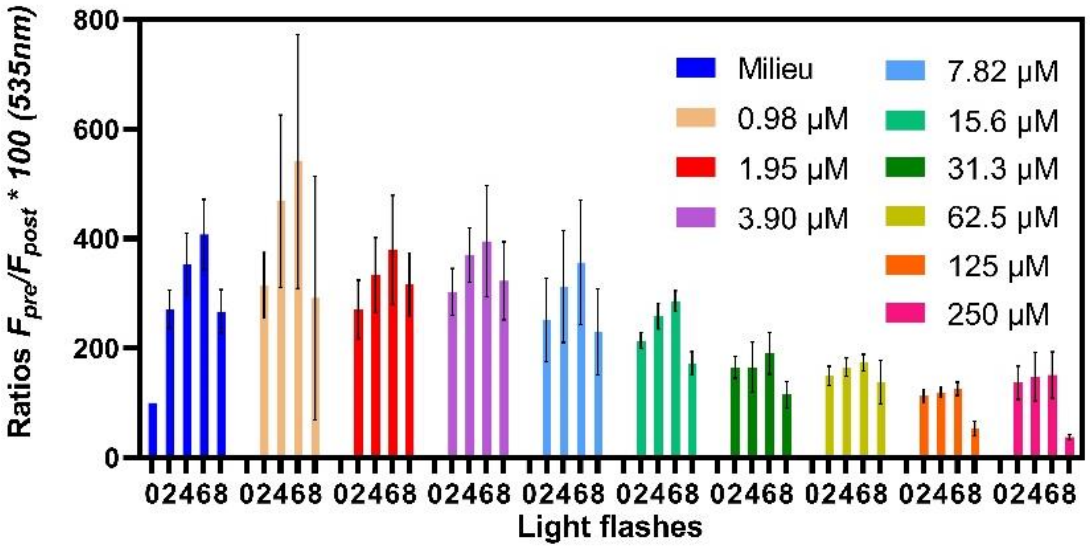


Figure 3 : Résultats de l'évaluation de la dose réponse de la chloroquine en fonction du nombre d'illuminations appliquées. Résultats des ratios en fonction de la concentration et des différents nombres de flash lumineux appliqués.

entre le rapport obtenu avec et sans Chloroquine. De plus, il n'y a pas de différences significatives ni entre 8 µM et 16 µM de TO, ni entre les essais sur un et cinq sphéroïdes/puits. Par conséquent, la concentration de 8 µM de TO et l'utilisation d'un seul sphéroïde/puits ont été choisies pour le reste des expériences. Enfin, le paramètre d'illumination a été évalué en commençant par deux éclairs de LED à 470 nm, 24 mW.cm^{-2} pendant 10 s et en augmentant ce nombre deux par deux comme le montre la Figure 2 (c). Le signal maximum a été obtenu avec six flashs lumineux, donc avec six illuminations LEDs à 470 nm, 24 mW.cm^{-2} pendant 10 s. Le temps d'incubation du TO a été doublé par rapport aux expériences en 2D. Nous avons donc réussi à optimiser le test LUCS sur des sphéroïdes en utilisant un sphéroïde par puits, une concentration de TO de 8 µM et une illumination avec six flashs lumineux à 470 nm, 24 mW.cm^{-2} pendant 10 s.

Pour les déterminations de dose réponse, les rapports R obtenus pour toutes les concentrations testées d'un agent chimique donné ont été ajustés à l'aide du logiciel GraphPad Prism (dont la licence a été fournie par l'entreprise AOP) par un modèle mathématique de régression non linéaire présenté dans (Gironde, Dufour, et Furger 2020). La concentration efficace demi-maximale (EC_{50}) et les valeurs de R^2 ont été déduites du modèle de régression.

2.3 DETERMINATION DE DOSES REPONSES DE DIFFERENTS AGENTS CHIMIQUES

Les agents chimiques qui ont été choisis d'être testés sur sphéroïdes sont tous hépatotoxiques de façon à tenter une caractérisation de mort cellulaire par mesure RF : la Chloroquine, Méthanol et la Trichostatine A (TSA). Elles ont toutes les trois des mécanismes d'action différents mais nous ne rentrerons pas dans ce détail d'analyse à ce stade de l'étude.

Le marquage des cellules par le TO et les différents composés chimiques ont été réalisés dans un milieu sans sérum afin d'éviter toute interaction avec les composants. Comme le test LUCS a été optimisé pour les sphéroïdes, une dose réponse de Chloroquine, Méthanol et TSA ont été réalisée avec des concentrations respectives de 1.95 µM à 250 µM, de 0.10 à 24.7mM et de 0.04 à 10µM respectivement. Cela a été fait deux fois avec des tripliqua dans chaque expérience. De plus, les flashs lumineux de deux à huit en nombre ont été testés pour chaque concentration de chloroquine, permettant de confirmer le bon choix de six flashs lumineux pour la détermination de dose réponse (Figure 3). Les résultats de la dose réponse de l'expérience avec le meilleur facteur de corrélation sont présentés dans la Figure 4 a) et le Tableau 7. En fait, les deux réponses de dose étaient équivalentes avec le facteur de confiance choisi à 95%. L'EC_{50} de la chloroquine obtenue est de 16,09 µM avec un coefficient de corrélation de 0,9832. Pour l'expérience de culture cellulaire 2D, l'EC_{50} de la chloroquine est de 55,48 µM avec un coefficient de corrélation de 0,9901. Ces valeurs sont cohérentes avec la littérature (Ramaiahgari et al. 2014; Sirenko et al. 2016). Pour l'EC_{50} du Méthanol et de la TSA, nous obtenons un EC_{50} de 15.45mM et 0.1270µM avec des R^2 de 0.8779 et de 0.9499 respectivement.

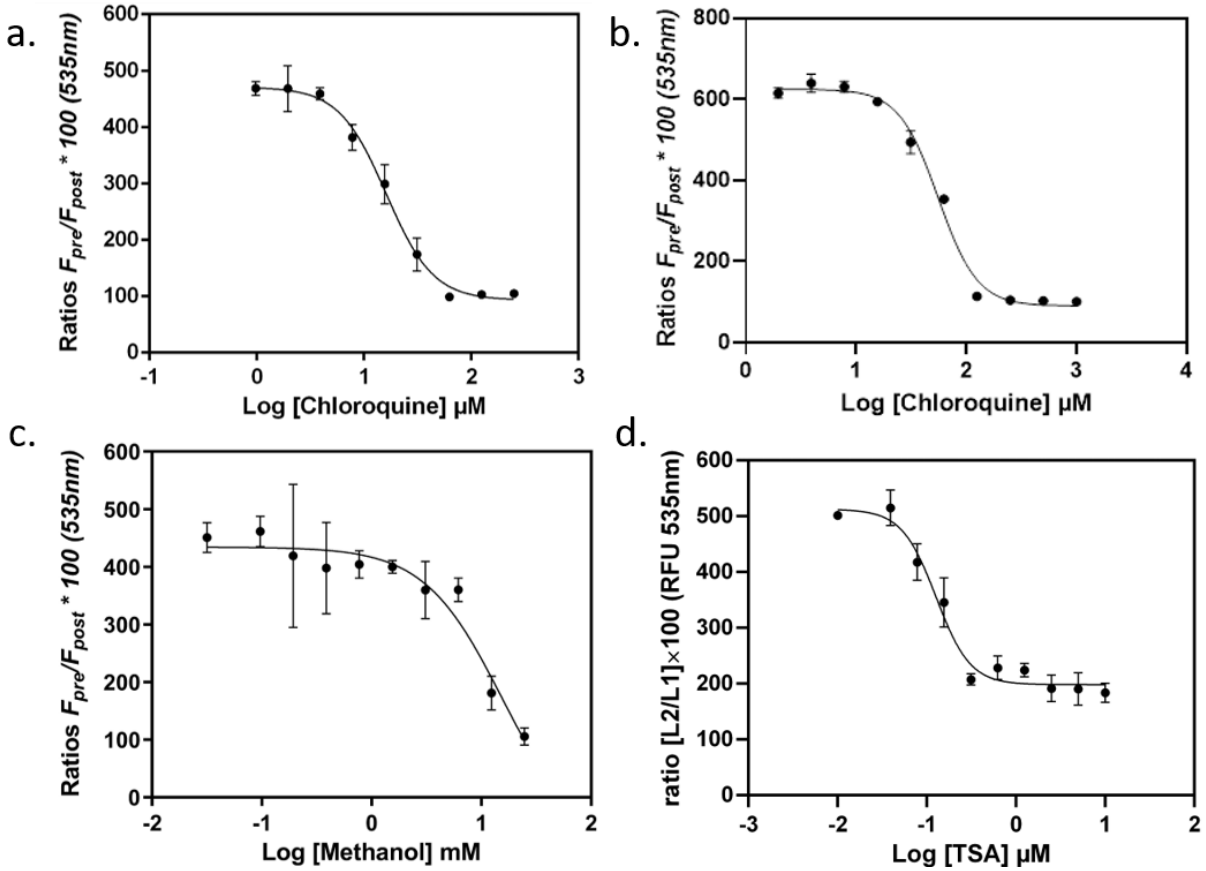


Figure 4 : Évaluation de la cytotoxicité de différents agents chimiques. a) Dose réponse de chloroquine sur sphéroïde de cellules HepG2 déterminée par la méthode LUCS optimisée pour cet objet d'étude. TO à 8 µM pendant 1h. La détermination de la dose réponse de la chloroquine a été effectuée deux fois et seul celui ayant le meilleur R^2 a été conservé et présenté ici. b) Dose réponse de la chloroquine sur cellules HepG2 en culture 2D déterminée par la méthode LUCS afin de discuter de la différence entre cellules mise en culture en 2D et en 3D. Le TO a été utilisé à 4 µM avec un seul flash lumineux. c) Dose réponse du méthanol sur sphéroïde de cellules HepG2. d) Dose réponse de la Trichostatin A (TSA) sur sphéroïde de cellules HepG2.

Les sphéroïdes HepG2 ont des caractéristiques plus proches des hépatocytes primaires en termes d'expression et de fonction des gènes que les cultures en 2D de HepG2, ce qui peut expliquer la différence entre l'EC_{50} de la chloroquine pour l'expérience 2D et 3D, puisqu'il existe des différences d'organisation cellulaire entre les deux cultures. Par exemple, en 2D, les cellules sont moins en contact les unes avec les autres que dans un micro-tissu et il n'y a pas de formation de matrice extracellulaire (Fennema et al. 2013; Santini et Rainaldi 1999) avec pour conséquence que les sphéroïdes sont plus sensibles à la toxicité de la Chloroquine que pour la culture cellulaire 2D. En fonction des agents hépatotoxiques utilisés, les EC_{50} trouvées dans les modèles de culture cellulaire 3D et 2D peuvent être identiques, inférieures ou supérieures les unes aux autres (Sirenko et al. 2016; Elje et al. 2019).

Tableau 7 : Récapitulatif des valeurs de doses réponses en fonction des paramètres de culture et de l'agent chimique utilisé.

Agents chimiques	**Chloroquine**		**Méthanol**	**TSA**
Paramètre de culture	Sphéroïde	Culture 2D	Sphéroïde	Sphéroïde
EC50	16.09 µM	55.48 µM	15.45 mM	0.1270 µM
R^2	0.9832	0.9901	0.8779	0.9499
Intervalle de confiance 95%	[13.96 ; 18.55]	[50.47 ; 60.79]	[1.426 ; 2.945e+007]	[0.1004 ; 0.1605]

Maintenant que nous avons déterminé les concentrations efficaces médiane (EC_{50}), des différents agents chimiques sélectionnés, nous savons à quelle concentration se placer pour être en condition de cytotoxicité pour les caractérisations RF.

3 MESURE D'ETAT BIOLOGIQUE STATIQUE

3.1 PROTOCOLE

Le micro-dispositif fabriqué est caractérisé avec un VNA connecté au composant à l'aide de deux sondes coplanaires et de deux câbles coaxiaux et calibré en utilisant une technique de type SOLT. Les mesures sont effectuées de 500 MHz à 20 GHz. La méthode de deembending développée dans le Chapitre 2 est utilisée ici pour déterminer la capacitance et la conductance modélisant l'échantillon biologique à partir d'un circuit électrique équivalent. Pour mieux mettre en évidence les variations électriques entre le milieu hôte et l'entité testée, des contrastes de ces paramètres sont considérés.

Les mesures sont donc réalisées en trois étapes successives : d'abord la mesure du dispositif à vide, puis avec le fluide de référence (soit du PBS pour les micro-tissus fixés, soit du milieu de culture pour les sphéroïdes vivants et ceux traités avec un agent chimique) et ensuite la mesure du dispositif avec l'objet biologique chaque minute pendant quinze minutes. Le temps global nécessaire pour effectuer la mesure d'un seul sphéroïde est donc d'environ 20 minutes puisque le dispositif est déjà chargé du fluide de référence.

Enfin, des tests statistiques ont été effectués sur le logiciel GraphPad Prism avec une ANOVA ordinaire à sens unique avec test de comparaison multiple de Turkey, comportant une seule variance groupée basée sur les contrastes normalisés expérimentaux (en pourcentage) calculés afin de permettre une comparaison entre ces deux paramètres :

$$\Delta C/C = \frac{C_{DUT} - C_{REF}}{C_{REF}} \times 100 \quad (1)$$

$$\Delta G/G = \frac{G_{DUT} - G_{REF}}{G_{REF}} \times 100 \quad (2)$$

3.2 RESULTATS & DISCUSSIONS

La procédure expérimentale décrite précédemment a été utilisée pour réaliser, dans un premier temps, quelques mesures des fluides de référence sur des balayages de fréquence de 0,5 à 20 GHz (PBS et milieu de culture sans sérum) représentées sur la Figure 5 par la mesure proche de zéro. Grâce à la conception fluidique, le blocage du sphéroïde est très rapide, une minute suffit puisqu'une fois le sphéroïde positionné manuellement dans le bassin (grâce à une micropipette de 200 µL) de la partie inférieure du dispositif, le débit est alors suffisant pour attirer le sphéroïde directement sur la zone de détection. Dès que le sphéroïde se trouve sur la zone de détection, un chronomètre est lancé avec la première mesure des paramètres S. Chaque minute, une mesure est faite pour finalement obtenir une valeur moyenne et un écart-type sur 12 min : il y a un temps de stabilisation de trois minutes, non inclus dans l'analyse des données.

11 sphéroïdes fixés, 8 sphéroïdes vivants et 7 sphéroïdes soumis à la Chloroquine ont été mesurés et sont représentés dans la Figure 5. Les diamètres des sphéroïdes étaient respectivement de 190 à 460 µm, de 198 à 268 µm et de 204 à 398 µm. Tous ces sphéroïdes ont été fabriqués exactement selon le même protocole détaillé précédemment, mais les traitements chimiques ont augmenté la dispersion des diamètres. Ceux-ci ne sont pas indiqués sur les figures car pour toutes les configurations évaluées, aucune corrélation entre la taille du sphéroïde et la signature RF n'a été trouvée. Les différents traitements chimiques ont été réalisés comme suit : pour la fixation, du paraformaldéhyde est utilisé pendant 2h avant

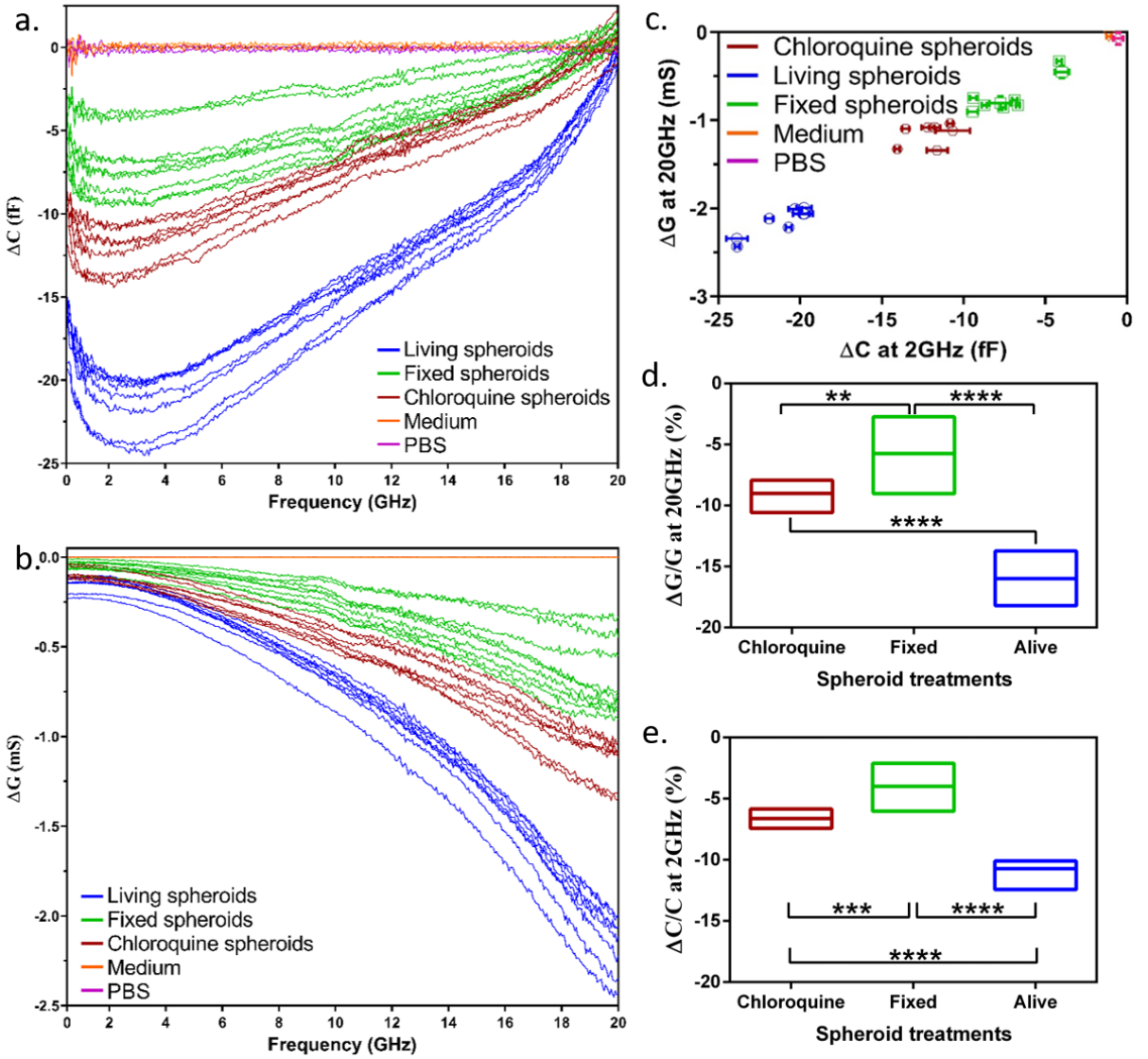


*Figure 5 : Mesure RF de sphéroïdes en fonction du traitement chimique appliqué. a) et b) Spectre en fréquence de différents états des sphéroïdes. En orange et rose, respectivement la signature du PBS et du milieu ; en vert la signature RF des sphéroïdes fixés, en marron la signature RF des sphéroïdes traités au 500µM, enfin en bleu les sphéroïdes vivants. Seules les moyennes sont représentées, l'écart-type est présenté dans la Figure 6. c) Représentation dans le plan complexe du sphéroïde à différents états, le code couleur est le même que celui de la Figure 5 a) et b). La moyenne et l'écart-type obtenus par les différentes mesures effectuées pendant 12 minutes (sans les 3 premières minutes, considérées comme un temps de stabilisation) pour les axes x et y sont représentés. d) et e) Analyse statistique des signatures RF à 2 GHz pour les ΔC/C et à 20 GHz pour les ΔG/G. Les résultats du test ANOVA sont directement sur le graphique avec représentation de la valeur p : ** correspond à un p < 0,01 ; *** à un p < 0,001 et **** à un p < 0,0001. Pour les sphéroïdes traités à la Chloroquine, n = 7 ; pour les sphéroïdes fixés n = 11 et pour les vivants, n = 8.*

rinçage et stockage dans du PBS ; pour ceux traités à la chloroquine, ils sont incubés avec 250 µM de cet agent chimique pendant 24h avant de réaliser la mesure. Le choix de la concentration de la chloroquine a été fait à partir de l'étude « dose réponse » obtenue précédemment : l'EC_{50} déterminé vaut 16,09 µM ainsi, pour obtenir un effet cytotoxique sur les sphéroïdes après 24h, nous avons choisi une concentration de 250 µM afin d'être significativement au-dessus de l'EC_{50}.

Seuls sept sphéroïdes ont été testés pour les sphéroïdes traités à la Chloroquine car ils présentaient une désintégration partielle de leur structure entraînant des difficultés pour les manipuler. Les sphéroïdes fixés ayant des signatures RF beaucoup plus dispersés que les deux autres conditions (que ce soit pour le contraste capacitif ou conductif), davantage de sphéroïdes ont été mesuré pour tenter d'observer une tendance.

Les fréquences choisies pour l'analyse présentée en Figure 5 c) sont celles correspondant à des contrastes capacitif et conductif les plus importants : respectivement entre 500 MHz et 4 GHz, et 20 GHz. Premièrement, le capteur permet d'observer une différence significative de signature RF entre les sphéroïdes vivants (en bleu) et les sphéroïdes morts (fixes ou traités à la chloroquine). Deuxièmement, en fonction du traitement chimique cytotoxique sur les sphéroïdes, les signatures sont aussi significativement différentes comme le montre la Figure 5 d) et e). En effet, pour les deux fréquences choisies (2 GHz pour le contraste capacitif, et 20 GHz pour le contraste conductif), des tests ANOVA sur les contrastes normalisés des différents traitements des sphéroïdes montrent des différences significatives puisque les valeurs de p calculées sont toutes inférieures à 0,01. Une explication possible de la différence entre les sphéroïdes fixés et traités à la Chloroquine pourrait être que le processus de fixation crée des trous dans la membrane plasmique (Virtanen et al. 1984), conduisant à un équilibre entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule et expliquant une réponse plus proche du PBS. Enfin, la variabilité des signatures RF observée pour une même condition, pourrait être expliquée par les variabilités de taille et de forme des sphéroïdes qui sont difficiles à bien contrôler autrement que par l'analyse statistique.

Le dispositif micro-fabriqué présenté ici permet les premières mesures diélectriques de sphéroïdes dans leur milieu biologique pour des temps d'expériences court (seulement 20 min nécessaires pour mesurer un sphéroïde). Cette technologie et méthodologie associée, nous a permis l'analyse RF des différents traitements grâce à des échantillons d'une dizaine de sphéroïdes testés.

Dans cette étude, un dispositif micro-fabriqué basé sur une configuration fluidique fermée adaptée aux sphéroïdes de 300 µm de diamètre et optimisé en sensibilité a été développé et validé par la caractérisation diélectrique de sphéroïdes HepG2. Ces analyses d'objets biologiques sont non invasives, non destructives, sans marquages préalables et peu couteuses. En raison de l'attention croissante qu'elles suscitent, il existe de plus en plus de techniques pour réaliser ce type d'analyses à différentes échelles d'expérimentation, partant du niveau de la cellule unique jusqu'à l'analyse de tissu complet (tel que des échantillons de biopsie) (Alexander, Price, et Bhansali 2013; Heileman, Daoud, et Tabrizian 2013; Lazebnik et al. 2007; 2005; Nerguizian et al. 2017; Petchakup, Li, et Hou 2017). Cependant, les études sur l'échelle intermédiaire qu'est le sphéroïde, ne sont réalisées que dans la gamme de

fréquences inférieure à 1 GHz. Alors même qu'au-delà du gigaHertz, la membrane plasmique ne fait plus écran aux ondes RF, ce qui permet d'analyser le cytoplasme via la sélectivité de réponse des ondes RF entre l'eau liée et l'eau non liée. L'analyse dans cette gamme de fréquences ouvre un nouveau champ d'intérêt. De plus, ce nouveau système permet de mesurer directement dans le milieu de culture, ce qui est intéressant pour développer des expériences de test de médicaments. En effet, les modèles cellulaires 3D, tels que les sphéroïdes, représentent une morphologie et un comportement beaucoup plus proches de la réalité *in vivo* et constituent un modèle plus réaliste dont les résultats obtenus sont ainsi plus pertinents.

4 SUIVI EN TEMPS REEL DE REPONSES BIOLOGIQUES

Le micro-dispositif a été imaginé afin de permettre la mesure RF de sphéroïde dans un flux constant de milieu de culture pour maintenir l'objet dans un état biologique constant. La suite logique, et qui permet de mettre à profit cette spécificité est l'étude en temps réel de réponses biologiques de sphéroïdes soumis à des traitements. Ainsi un protocole a été développé afin de faire la mesure de sphéroïde sous traitement chimique pendant 1h30. Ce protocole a été appliqué avec de la TSA à trois concentrations différentes : 335 µM (1000*EC_{90}), 127 µM (1000*EC_{50}) et à 0.335 µM (EC_{90}), deux largement au-dessus de l'EC_{50} et une usuellement utilisée l'EC_{90}.

4.1 PROTOCOLE

Des sphéroïdes sont fabriqués de la façon décrite précédemment dans le Chapitre 2 avec les micro-tissus sigma ; une fois élaborés, ils sont individualisés dans des puits à fond ronds non adhérents dans du milieu de culture contenant : de l'HEPES à 25mM (solution tampon permettant de maintenir des conditions d'acidité équivalente à la présence de CO_2 dans l'environnement des cellules) ; un mélange d'antibiotique Pénicilline-Streptomycine (aussi utilisé pendant la culture cellulaire) ; et surtout sans sérum de veau (permettant la croissance des cellules) afin de maitriser la taille des sphéroïdes. Ces sphéroïdes individualisés sont conservés dans un incubateur à 37°C et 5% de CO_2 pendant trois jours maximums.

S'agissant des mesures RF : un dispositif au VNA (via sonde et câble) et la saturation de ce dernier est réalisés pendant 15min environ. Cette saturation permet la bonne mise en flux (de retirer toutes les bulles potentielles) et a pour vocation de saturer les murs de résine en milieu. Après cette saturation, de la TSA à la concentration choisie est mise dans le dispositif pendant 3min : elle servira de valeur de référence pendant l'expérience comportant le sphéroïde + TSA. Pour rincer la TSA, du milieu est passé dans le dispositif pendant 3min et une

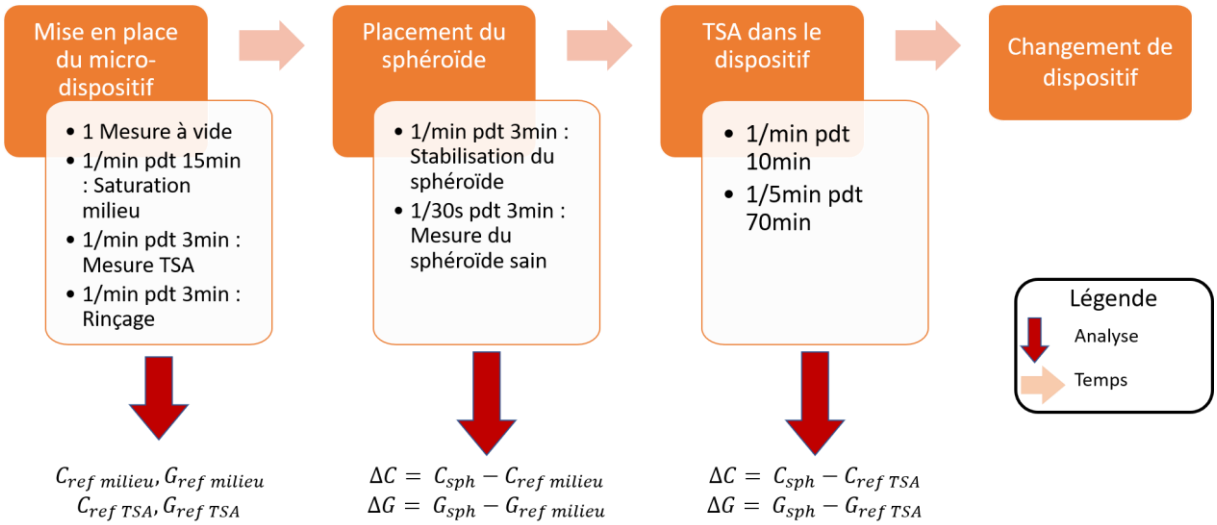


Figure 6 : Diagramme temporel représentant le protocole de mesure en temps réel de sphéroïde traité avec de la TSA.

mesure du milieu est prise sur la dernière minute : elle servira de référence pour les mesures du sphéroïde sans TSA. Le micro-dispositif est alors prêt à recevoir un sphéroïde.

Un sphéroïde est donc positionné dans le dispositif et le chronomètre lancé. Une mesure est réalisée toutes les minutes afin d'observer le moment où le sphéroïde s'est stabilisé dans le dispositif (3-4 min environ). Des mesures RF sont ensuite réalisées toutes les 30s pendant 3min afin d'avoir une valeur moyenne du sphéroïde sain, sans TSA ; permettant de s'assurer que le sphéroïde est en « bonne santé » avant d'appliquer un traitement chimique. Ensuite, la TSA à la concentration choisie est ajoutée dans le dispositif : des mesures sont alors réalisées toutes les minutes pendant les 10 premières minutes d'exposition à la TSA, puis une mesure toutes les 5 minutes jusqu'à 1h30 (voir Figure 6).

L'analyse des résultats obtenus se fait en plusieurs étapes. Tout d'abord, ne seront présentés dans ce chapitre que les contrastes obtenus après l'ajout de TSA puisque des contrastes n'ayant pas la même valeur de référence ne sont pas comparables. L'origine du temps est donc placée à la première valeur prise après ajout de TSA dans le dispositif. La Figure 7 montre un exemple de série de spectre en fonction de la fréquence, obtenu pour un sphéroïde traité avec une concentration de 0.3351µM (EC_{90}). Afin de réaliser une étude de la cinétique observée il a été décidé de se concentrer sur une fréquence par paramètre, celle permettant la meilleure discrimination de chacune des courbes : 2GHz pour le contraste capacitif et 20GHz pour le contraste conductif. De plus, afin de comparer les sphéroïdes entre eux au sein d'une même concentration testée, il a été décidé de ne pas représenter le contraste capacitif et conductif mais un contraste dit cinétique de ces deux mêmes paramètres, exprimés comme suit :

$$\Delta C_{cinétique}(t) = \Delta C_{2GHz}(t) - \Delta C_{2GHz}(t=0) \quad (3)$$

$$\Delta G_{cinétique}(t) = \Delta G_{20GHz}(t) - \Delta G_{20GHz}(t=0) \quad (4)$$

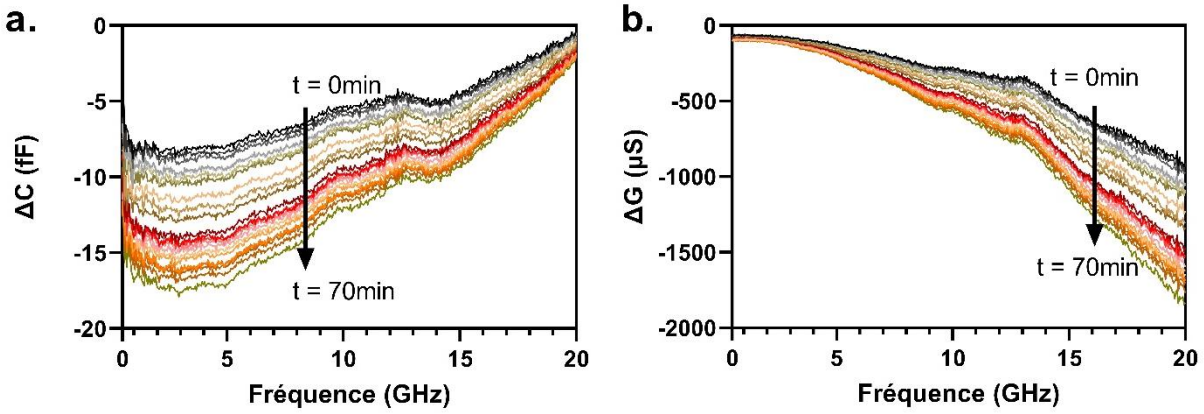


Figure 7 : Exemples de spectres de contrastes capacitifs (a) et conductifs (b) obtenus pour un sphéroïde traité avec de la TSA pendant 70min.

4.2 RESULTATS & DISCUSSIONS

Les résultats des mesures RF de chacune des conditions évaluées en fonction du temps sont présentés dans les six graphiques (trois lignes et deux colonnes) de la Figure 8. Chaque ligne de la Figure 8 correspond à une concentration donnée : a) et b) à la concentration de 335 µM (1000*EC_{90}) ; c) et d) à la concentration 127 µM (1000*EC_{50}) ; e) et f) correspondant à 0.335 µM (EC_{90}). Chaque colonne correspond à un paramètre électrique, c'est-à-dire a), c) et e) représentent le contraste capacitif à 2 GHz et b), d) et f) représentent le contraste conductif à 20 GHz. Un sphéroïde contrôle a été mesuré dans son milieu de culture et est représenté en bleu sur tous les graphes, il permet de mesurer la dérive dans le temps des mesures.

Le contraste cinétique maximum en valeur absolu observé sur le sphéroïde contrôle est représenté par deux traits pointillés en positif et négatif autour de zéro. Toute mesure sortant de cette zone encadrée par des pointillés peut donc être considéré comme une variation significative dû au traitement chimique appliqué, ici la TSA. Grâce à cette définition nous pouvons déterminer le temps minimal à partir duquel notre dispositif est capable de mesurer une différence significative liée à l'application d'un traitement chimique : il est d'environ 7min pour toutes les concentrations de TSA. Dit autrement, l'influence de la TSA est observée dès la 8ème minute d'exposition alors même que la plupart des études biologiques décrivant le mode d'action de la TSA sur des cellules de type HepG2 sont réalisées après au minimum 24h d'exposition (Herold et al. 2002; H. Yang et al. 2010; Shi et al. 2014; Shin et al. 2017; Sanaei, Kavoosi, et Salehi 2017; Sanaei et al. 2018). Ces résultats restent donc à confirmer puisque peu d'article constate une influence de la TSA dès 30min (Carlisi et al. 2008). La TSA est un inhibiteur de l'histone désacétylase, enzyme permettant la modification des histones de l'ADN, modification essentielle pour le bon fonctionnement des cellules mammifères (Sanaei et al. 2018). La TSA empêche ainsi la prolifération des cellules provoquant le déclenchement de l'apoptose, détecté ici de façon précoce (< 10 min) (Herold et al. 2002; H. Yang et al. 2010; Shi et al. 2014; Shin et al. 2017; Sanaei, Kavoosi, et Salehi 2017; Sanaei et al. 2018; Carlisi et al. 2008).

Afin d'étudier cette cinétique de façon quantitative nous avons décidé d'extraire des paramètres de chacune des courbes présentées à la Figure 8 : la pente à l'origine de chacun des sphéroïdes, calculé avec les points entre 0 et 8 min d'exposition à la TSA et le contraste dit à $t = \infty$ calculé en réalisant la moyenne de tous les points après 50 min d'exposition à la TSA. Ces résultats sont présentés dans le Tableau 8 et représenté en fonction de la concentration de la TSA et du diamètre du sphéroïde testé dans la Figure 9. Pour chaque pente à l'origine calculée, le coefficient de corrélation R^2 associé est donné dans le Tableau 8. Enfin, des moyennes de chaque paramètre en fonction de la concentration utilisée ont été calculées.

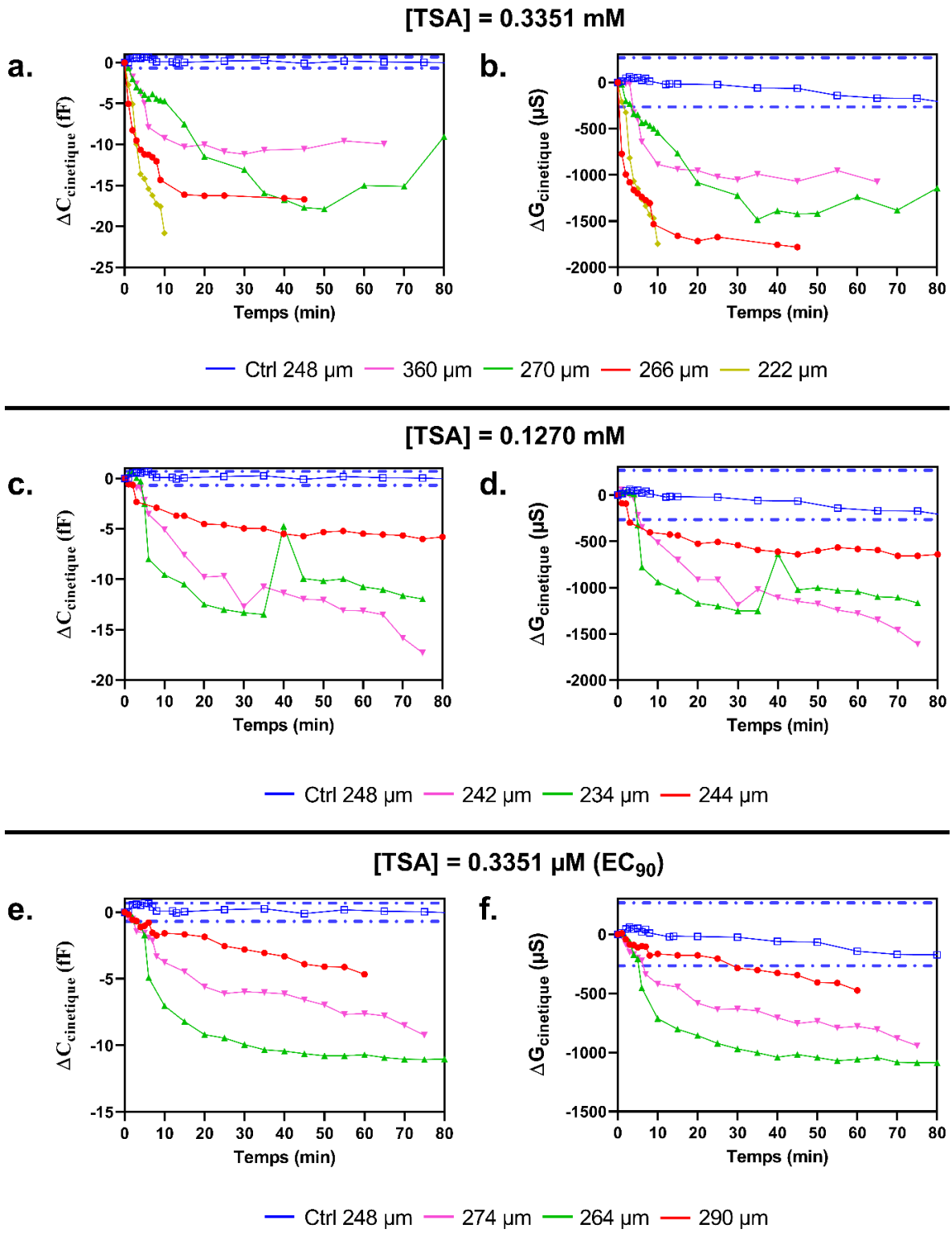


Figure 8 : Mesure RF en fonction du temps à différentes concentrations de TSA pour différents sphéroïdes. a) et b) sont respectivement le contraste capacitif à 2 GHz et conductif à 20 GHz soumis à la concentration de TSA de 335 µM. c) et d) sont respectivement le contraste capacitif à 2GHz et conductif à 20 GHz soumis à la concentration de TSA de 127 µM. e) et f) sont respectivement le contraste capacitif à 2 GHz et conductif à 20 GHz soumis à la concentration de TSA de 0.335 µM, correspondant à l'EC_{90}. Chaque couleur de ligne pleine par graphe correspond à un sphéroïde particulier dont le diamètre est précisé en dessous des graphes. Les lignes pointillés bleue correspondent à la valeur de $\Delta C_{cinétique}$ ou de $\Delta G_{cinétique}$ maximum pour le sphéroïde contrôle : une façon de mesurer la dérive de mesure et donc de déterminer à partir de quand il est possible de mesurer significativement l'influence de la TSA sur la mesure RF du sphéroïde considéré. Ctrl = contrôle, c'est-à-dire sans TSA.

Tableau 8 : Résultats des analyses de pente à l'origine et de valeurs de contrastes à $t = \infty$ des expériences TSA sur sphéroïde en temps réels.

Paramètres extraits à partir de		$\Delta C_{cinétique}$			$\Delta G_{cinétique}$		
Concentrations TSA testée	**Diamètres sphéroïdes (µm)**	**Pente à l'origine (fF/min)**	**R²**	**Moyennes des mesures après 50min (fF)**	**Pente à l'origine (µS/min)**	**R²**	**Moyennes des mesures après 50min (µS)**
335 µM *(1000*EC90)*	266	-2,5766	0,9025	-16,626	-263,68	0,78	-1769,4
	270	-0,9236	0,9786	-14,263	-88,992	0,9432	-1333,0
	360	-0,9359	0,9942	-9,7460	-64,976	0,5293	-1034,1
	222	-3,4463	0,9829		-274,91	0,9563	
	Moyenne	***-1,9706***		***-13,545***	***-173,14***		***-1378,9***
127 µM *(1000*EC50)*	214	-0,7047	0,8266	-5,5803	-90,348	0,8443	-615,49
	234	-1,1019	0,5888	-10,915	-109,56	0,5872	-1075,4
	242	-0,5439	0,8563	-14,15	-58,542	0,7346	-1352,7
	Moyenne	***-0,7835***		***-10,217***	***-86,150***		***-1014,5***
0.335 µM *(EC90)*	290	-0,1873	0,8285	-4,2847	-17,664	0,8118	-430,82
	264	-0,6713	0,7074	-10,898	-68,666	0,8152	-1067,3
	274	-0,3017	0,938	-7,4183	-44,796	0,9561	-822,86
	Moyenne	***-0,3868***		***-7,5337***	***-43,709***		***-773,67***
CTRL	248	0,1631	0,7353	-0,0818	13,816	0,7305	-129,01

La Figure 9 a) et b) présente les pentes à l'origine (a) et le contraste à $t = \infty$ (b) en fonction de la concentration de TSA. Bien que le nombre d'expériences soit limité, il apparait clairement une augmentation de la cinétique initiale (quantifiée ici par la pente à l'origine des contrastes cinétiques introduits par les relations (3) et (4)) avec la concentration de TSA. Cette constatation renforce, une fois de plus, le caractère précoce de détection des réponses biologiques à des traitements démontré par notre technologie.

La Figure 9 c) et d) représente également les pentes à l'origine en fonction du diamètre du sphéroïde montrent qu'au sein d'une même condition de concentration une certaine corrélation existe. En effet, sur 6 régressions linéaires réalisées seulement 2 ont un coefficient de corrélation R^2 inférieur à 0.9. Les pentes des régressions linéaires pour lesquelles R^2 est supérieur à 0,9 sont proches (pour le $\Delta C_{cinétique}$: 0,0181 et 0,0176 pour les concentrations de 335 µM et 0,335 µM respectivement ; et pour le $\Delta G_{cinétique}$: 1,615 et 1,937 pour les concentrations de 335 µM et 0,335 µM respectivement), indiquant qu'une corrélation (toute relative) vis-à-vis de la concentration peut exister. Le nombre d'échantillons par conditions ($n = 3$) est largement insuffisant pour tenter une quelconque hypothèse expliquant ces résultats.

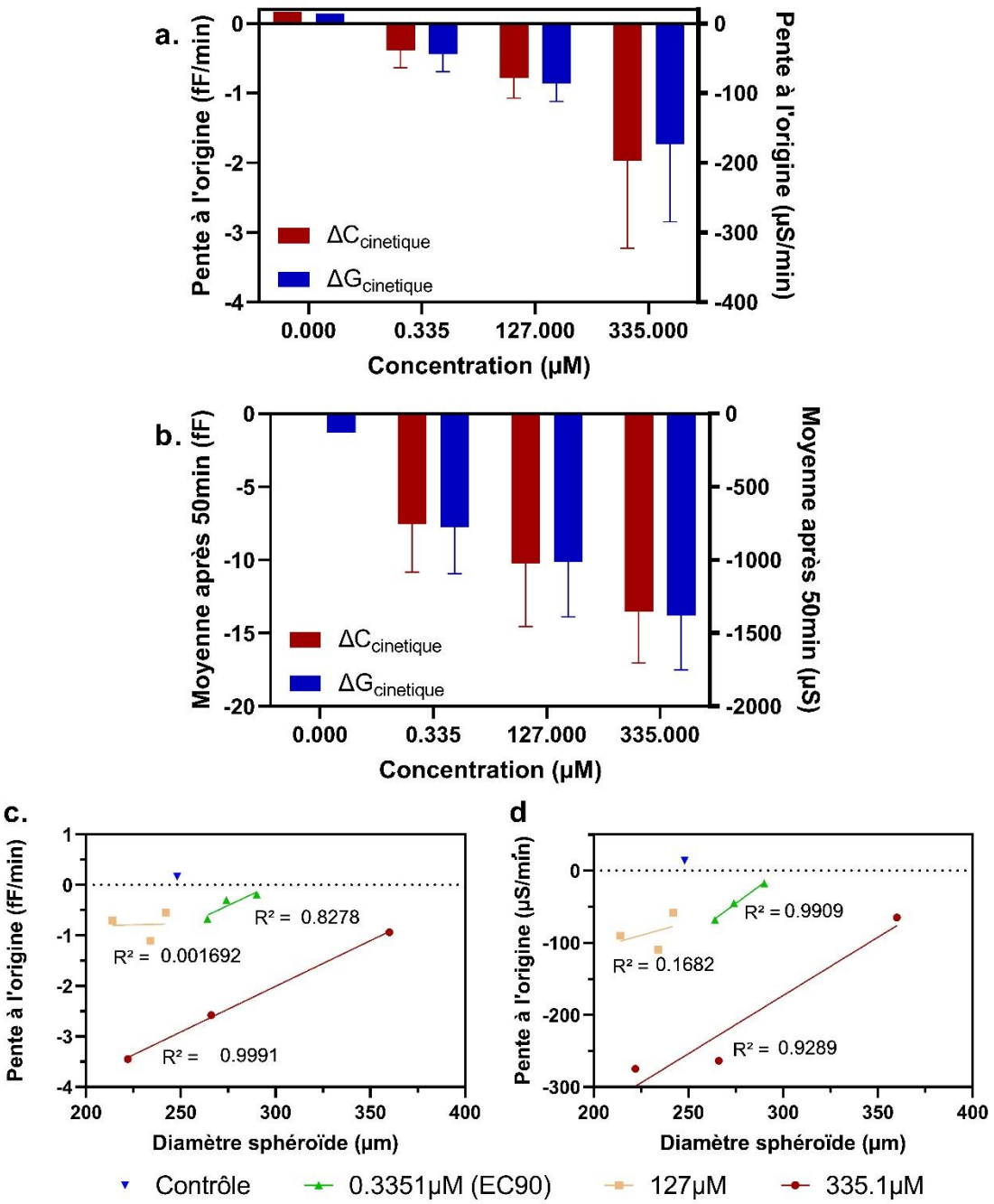


Figure 9 : Représentation graphique des données du Tableau 2. a) Analyse des pentes à l'origine obtenu en fonction de la concentration de TSA et du paramètre dont elles sont issues. b) Analyse des valeurs à t = ∞ obtenues en fonction de la concentration en TSA et du paramètre dont elles sont issues. c) et d) Analyse des pentes à l'origine obtenu en fonction du diamètre du sphéroïde testé et du paramètre regardé. Les lignes pleines représentent les régressions linéaires des différents paramètres analysés en fonction du diamètre du sphéroïde, leur coefficient de corrélation sont notés au plus proche des courbes. c) Les pentes à l'origine sont obtenues à partir du $\Delta C_{cinétique}$ et d) à partir du $\Delta G_{cinétique}$.

5 CONCLUSIONS

En conclusion, la technique LUCS a été améliorée avec succès d'un système cellulaire 2D à un système 3D, et validée par l'EC_{50} obtenue pour la chloroquine sur des sphéroïdes qui est cohérent avec la bibliographie.

Le nouveau dispositif micro-fluidique développé dans le Chapitre précédent a démontré ses capacités de mesures d'état biologique statique (pour lesquelles le traitement est réalisé en amont de la mesure RF). De plus, les résultats ont prouvé qu'il permet de différentier significativement deux traitements cytotoxiques : chloroquine et fixation par paraformaldéhyde.

Enfin, l'optimisation fluidique et en sensibilité montre des possibilités de différenciation précoce de différents traitements chimiques cytotoxiques sur des sphéroïdes HepG2 de 300 µm de diamètre. En effet, le suivi peut être réalisé pendant 50 min d'exposition à un traitement chimique et une influence de celui-ci est significativement mesurable à partir de la 8ème minute. Ce résultat est d'autant plus intéressant que la plupart des études biologiques réalisées sur l'effet de la TSA sur des cellules de la lignée cellulaire HepG2 ne démontrent qu'un impact à partir de 30 min d'exposition. Les résultats préliminaires (le nombre d'expériences – $n = 3$ – étant trop faible pour en proposer une interprétation pour le moment), permettent de proposer qu'une corrélation pourrait exister entre les deux paramètres cinétiques (la pente à l'origine et la valeur à $t = \infty$) et la concentration appliquée ; mais aussi entre l'un des paramètres (la pente à l'origine) et les diamètres des sphéroïdes testés. Ces résultats sont très prometteurs pour le criblage ultérieur de médicaments.

Conclusions & Perspectives

Conclusions

L'état de l'art présenté en début de ce manuscrit a permis de montrer l'intérêt de réaliser des expériences sur des sphéroïdes comme modèle du cancer. En effet, leurs structures en trois dimensions et la façon de les fabriquer leur permettent de développer des caractéristiques proches des tumeurs réelles : comme par exemple les différents gradients qui les composent lier à la densité au centre qui augmente à mesure que la taille globale augmente.

Les principales méthodes de caractérisation de ce type de système biologique restent majoritairement des procédés de marquage immunofluorescent permettant des observations par microscopie associée à des méthodes biochimiques tels que les PCR. Cependant ces méthodes sont invasives, destructives et demandent un important pré-traitement des échantillons. Depuis quelques années, de nouveaux instruments de mesures d'étude d'échantillons biologiques ont été développés par des physiciens, en complémentarité aux méthodes traditionnelles. Notamment en utilisant les interactions des ondes électromagnétiques avec les tissus vivants. En effet, en fonction de la fréquence appliquée, les phénomènes observables ne sont pas les mêmes : à basse fréquence (jusqu'au MHz) il est possible d'étudier les membranes des cellules et les échanges qui se font à sa surface, puis à partir des gigahertz, la membrane ne faisant plus écran aux ondes, il est alors possible de sonder le milieu intracellulaire. Cette dernière gamme de fréquence est d'autant plus prometteuse qu'il a déjà été prouvé que la différentiation de lignées cellulaires de lymphomes B est possible à l'échelle de la suspension cellulaire (Grenier et al. 2018), ou encore de faire de la différentiation de traitement chimique (A. Tamra et al. 2019; Zedek, Dubuc, et Grenier 2017) ; laissant entendre la possibilité d'utiliser cette technique en criblage de médicaments. Les dispositifs utilisant la spectroscopie diélectrique existent à différentes échelles biologiques, mais aucun n'existe pour l'échelle intermédiaire que représente le sphéroïde.

Ces travaux se sont donc attelés à combler ce vide dans la bibliographie. En effet, un premier dispositif fluidique ouvert a été développé et a permis de réaliser les toutes premières caractérisations diélectriques de sphéroïdes sur la gamme de fréquence de 0,5 à 20 GHz. Il a alors été développé une méthode d'analyse des paramètres S mesurés afin d'en extraire la capacitance et conductance de l'objet étudié grâce à un schéma électrique équivalent. Ce modèle a été validé par la caractérisation de billes de polystyrènes (Peytral-Rieu, Grenier, et Dubuc 2021). Cependant la caractérisation expérimentale de ce dispositif ouvert a montré des limites liées au non control du positionnement de l'objet et à l'évaporation. Une caractérisation quantitative a permis d'en prédire les dérives observées.

La meilleure des situations étant de ne pas avoir de dérive lors de la mesure, plutôt que de la prédire, il a été décidé de développer un nouveau micro-dispositif. Le cahier des charges étant de supprimer les problèmes de positionnement de l'objet et d'évaporation : un dispositif fluidique fermé possédant un piège hydrodynamique devait être développé. Un état de l'art des pièges fluidiques d'objets biologiques se rapprochant du sphéroïde a donc permis de déterminer quels types de piège seraient utilisés. De plus, dans l'équipe des pièges fluidiques mécaniques avaient été développés et étudiés pour un piégeage de cellule unique :

ces travaux ont servi de base à notre réflexion. Une architecture a donc été imaginée permettant d'avoir une structure possible à réaliser en microfabrication et qui serait efficace malgré la taille importante de sphéroïdes de 300 µm de diamètre. Cette solution a tout d'abord été fabriquée grâce à du PDMS, matériau bon marché, permettant de faire la preuve de concept du bon fonctionnement d'un piège de ce type. Cependant l'adhérence du PDMS sur les plaquettes possédant les structures RF étant compliquée, il a fallu développer une filière technologique de fabrication en salle blanche. Chacune des étapes a dû être optimisée pour le cas particulier de notre solution. Une fois le dispositif fluidique fermé fabriqué, il a été comparé quantitativement avec l'ancienne structure pour en prouver l'amélioration. Enfin, une amélioration de structure RF a été réalisée par simulations électromagnétiques et analyses expérimentales pour obtenir une structure fluidique optimisée possédant la meilleure sensibilité possible.

Un tel dispositif optimisé et fabriqué, il fallait montrer ses capacités sur une application cancérologique. Deux agents chimiques ont été choisis comme étant toxiques pour la lignée cellulaire utilisée et leur toxicité a été déterminée sur les sphéroïdes grâce à un test LUCS. Ce dernier a dû être préalablement optimisé pour permettre des mesures sur des échantillons de culture cellulaire en trois dimensions. Une fois la concentration de travail déterminée, deux types d'études RF ont été réalisées : une mesure d'état biologique statique, où le traitement par l'agent chimique était réalisé préalablement à la mesure RF ; et un suivi en temps réel d'un traitement chimique pendant 50 min. La première étude a permis de démontrer que le dispositif permet la différentiation significative de deux traitements chimique cytotoxique : la chloroquine et la fixation par paraformaldéhyde. La deuxième étude a permis de démontrer, d'une part que le système permet un suivi temps réel pendant 50 min, d'autre part il permet la différentiation significative de phénomènes biologiques à partir de la 8ème minute de mesure alors même que la plupart des études biologiques ne sont capables de mesurer des différences significatives qu'après au minimum 30 min d'exposition. Ces résultats sont très prometteurs quant aux capacités de ce nouveau dispositif pour du criblage de médicaments.

Perspectives

La première des perspectives de ce travail est la confirmation des résultats du dernier chapitre en augmentant le nombre de sphéroïdes testés pour chacune des concentrations étudiées de façon d'arriver à un $n = 5$ voire jusqu'à $n = 10$. Ces expériences permettraient de confirmer ou d'infirmer les hypothèses d'analyses cinétiques faite actuellement et d'essayer d'en tirer une interprétation. Cependant l'interprétation des résultats ne seraient que d'autant plus intéressante s'ils étaient multiplexés avec des méthodes plus classiquement utilisées en biologie de façon à caractériser plus précisément le phénomène biologique observé au travers de ces mesures.

Un autre axe de suite à ce travail est évidemment la multiplication des molécules testées afin de montrer la possibilité du dispositif à différentier précocement les impacts des différents traitements.

Une autre constatation amène un nouvel axe de développement : le sphéroïde est un objet biologique en trois dimensions alors que notre système d'électrodes RF actuel n'est qu'en deux dimensions. Il serait intéressant de développer un nouveau dispositif qui permettent d'explorer la troisième dimension, soit avec un dispositif réellement 3D, soit en augmentant le nombre d'électrodes de deux à quatre afin de « balayer » la troisième dimension. Un tel développement va demander des études théoriques afin d'exploiter les paramètres S alors mesurés. Puis également d'optimiser et de fabriquer ces électrodes en trois dimensions de façon à répartir au mieux les ondes électromagnétiques qui traverseront l'objet biologique. Tous les ingrédients seront alors réunis pour envisager des études de régionalisation au sein d'un sphéroïde. Un contrat de thèse a débuté sur ces aspects en octobre 2022.

Dans un futur plus lointain, c'est un dispositif qui pourrait être utilisé dans le cadre de la médecine personnalisée du cancer. En effet, des cellules cancéreuses d'un patient pourraient être prélevées, cultivées pour en faire des sphéroïdes et des traitements seraient alors testés sur ceux-ci : grâce à notre dispositif qui permet un suivi en temps réel et une détection précoce de réponse. Il manquerait une intégration et automatisation de toute l'instrumentation environnant le micro-dispositif.

Enfin, dans un futur encore plus lointain, les avancées de l'intégration/automatisation de la technologie développée dans nos travaux de thèse permettraient d'ouvrir la possibilité de ne plus être sur l'étude d'un unique sphéroïde mais sur l'étude de multiples sphéroïdes en même temps. Le développement d'une plateforme haut débit serait alors envisageable.

Références Bibliographiques

Références bibliographiques

Abreu, Sofia, Fernanda Silva, Rita Mendes, Teresa F. Mendes, Marta Teixeira, Vítor E. Santo, Erwin R. Boghaert, Ana Félix, et Catarina Brito. 2020. « Patient-derived ovarian cancer explants: preserved viability and histopathological features in long-term agitation-based cultures ». *Scientific Reports* 10 (1): 1-13. https://doi.org/10.1038/s41598-020-76291-z.

Agarwal, Rachit, Patrick Jurney, Mansi Raythatha, Vikramjit Singh, Sidlgata V. Sreenivasan, Li Shi, et Krishnendu Roy. 2015. « Effect of Shape, Size, and Aspect Ratio on Nanoparticle Penetration and Distribution inside Solid Tissues Using 3D Spheroid Models ». *Advanced Healthcare Materials* 4 (15): 2269-80. https://doi.org/10.1002/adhm.201500441.

Aldhaeebi, Maged A., Khawla Alzoubi, Thamer S. Almoneef, Sae ed M. Bamatraf, Hussein Attia, et Omar M. Ramahi. 2020. « Review of Microwaves Techniques for Breast Cancer Detection ». *Sensors* 20 (8): 2390. https://doi.org/10.3390/s20082390.

Alexander, Frank A., Dorielle Tucker Price, et Shekhar Bhansali. 2013. « From cellular cultures to cellular spheroids: Is impedance spectroscopy a viable tool for monitoring multicellular spheroid (MCS) drug models? » *IEEE Reviews in Biomedical Engineering* 6 (M): 63-76. https://doi.org/10.1109/RBME.2012.2222023.

Al-Husari, Maymona, Craig Murdoch, et Steven D. Webb. 2013. « A cellular automaton model examining the effects of oxygen, hydrogen ions and lactate on early tumour growth ». *Journal of Mathematical Biology* 69 (4): 839-73. https://doi.org/10.1007/s00285-013-0719-x.

Amann, Arno, Marit Zwierzina, Gabriele Gamerith, Mario Bitsche, Julia M. Huber, Georg F. Vogel, Michael Blumer, et al. 2014. « Development of an innovative 3D cell culture system to study tumour - Stroma interactions in non-small cell lung cancer cells ». *PLoS ONE* 9 (3). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092511.

Anada, Takahisa, Junji Fukuda, Yuko Sai, et Osamu Suzuki. 2012. « An oxygen-permeable spheroid culture system for the prevention of central hypoxia and necrosis of spheroids ». *Biomaterials* 33 (33): 8430-41. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.08.040.

Artis, Francois, Tong Chen, Thomas Chretiennot, Jean Jacques Fournie, Mary Poupot, David Dubuc, et Katia Grenier. 2015. « Microwaving biological cells: Intracellular analysis with microwave dielectric spectroscopy ». *IEEE Microwave Magazine* 16 (4): 87-96. https://doi.org/10.1109/MMM.2015.2393997.

Artis, Francois, David Dubuc, Jean-Jacques Fournie, Mary Poupot, et Katia Grenier. 2014. « Microwave Dielectric Spectroscopy of Cell Membrane Permeabilization with Saponin on Human B Lymphoma Cells ». In *2014 IEEE MTT-S International Microwave Symposium (IMS2014)*, 1-4. Tampa, FL, USA: IEEE. https://doi.org/10.1109/MWSYM.2014.6848520.

Arzumanian, Viktoriia A., Olga I. Kiseleva, et Ekaterina V. Poverennaya. 2021. « The Curious Case of the HepG2 Cell Line: 40 Years of Expertise ». *International Journal of Molecular Sciences* 22 (23): 13135. https://doi.org/10.3390/ijms222313135.

Aydinalp, Cemanur, Sulayman Joof, Ismail Dilman, Ibrahim Akduman, et Tuba Yilmaz. 2022. « Characterization of Open-Ended Coaxial Probe Sensing Depth with Respect to Aperture Size for Dielectric Property Measurement of Heterogeneous Tissues ». *Sensors* 22 (3): 760. https://doi.org/10.3390/s22030760.

Bakhtiari, Shide, Mohammad K. D. Manshadi, Amin Mansoorifar, et Ali Beskok. 2022. « A Microfluidic Dielectric Spectroscopy System for Characterization of Biological Cells in Physiological Media ». *Sensors* 22 (2): 463. https://doi.org/10.3390/s22020463.

Bao, Xiue, Ilja Ocket, Juncheng Bao, Jordi Doijen, Ju Zheng, Dries Kil, Zhuangzhuang Liu, Bob Puers, Dominique Schreurs, et Bart Nauwelaers. 2018. « Broadband Dielectric Spectroscopy of Cell Cultures ». *IEEE Transactions on Microwave Theory and Techniques* 66 (12): 5750-59. https://doi.org/10.1109/TMTT.2018.2873395.

Berridge, Michael V., Patries M. Herst, et An S. Tan. 2005. « Tetrazolium Dyes as Tools in Cell Biology: New Insights into Their Cellular Reduction ». In *Biotechnology Annual Review*, 11:127-52. Elsevier. https://doi.org/10.1016/S1387-2656(05)11004-7.

Bourrier, David, A. Ghannam, M. Dilhan, et H. Granier. 2014. « Potential of BPN as a New Negative Photoresist for a Very Thick Layer with High Aspect Ratio ». *Microsystem Technologies* 20 (10-11): 2089-96. https://doi.org/10.1007/s00542-014-2071-5.

Bruch, Richard, André Kling, Gerald A. Urban, et Can Dincer. 2017. « Dry Film Photoresist-Based Electrochemical Microfluidic Biosensor Platform: Device Fabrication, On-Chip Assay Preparation, and System Operation ». *Journal of Visualized Experiments*, n° 127 (septembre): 56105. https://doi.org/10.3791/56105.

Bürgel, Sebastian C., Laurin Diener, Olivier Frey, Jin Young Kim, et Andreas Hierlemann. 2016. « Automated, multiplexed electrical impedance spectroscopy platform for continuous monitoring of microtissue spheroids ». *Analytical Chemistry* 88 (22): 10876-83. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b01410.

Byun, Ikjoo, Anthony W Coleman, et Beomjoon Kim. 2013. « Transfer of Thin Au Films to Polydimethylsiloxane (PDMS) with Reliable Bonding Using (3-Mercaptopropyl)Trimethoxysilane (MPTMS) as a Molecular Adhesive ». *Journal of Micromechanics and Microengineering* 23 (8): 085016. https://doi.org/10.1088/0960-1317/23/8/085016.

Cai, Hongwei, Zhuhao Wu, Zheng Ao, Asael Nunez, Bin Chen, Lei Jiang, Maria Bondesson, et Feng Guo. 2020. « Trapping Cell Spheroids and Organoids Using Digital Acoustofluidics ». *Biofabrication* 12 (3): 035025. https://doi.org/10.1088/1758-5090/ab9582.

Canali, Chiara, Arto Heiskanen, Haseena Bashir Muhammad, Per Høyum, Fred Johan Pettersen, Mette Hemmingsen, Anders Wolff, Martin Dufva, Orjan Grøttem Martinsen, et Jenny Emnéus. 2015. « Bioimpedance monitoring of 3D cell culturing-Complementary electrode configurations for enhanced spatial sensitivity ». *Biosensors and Bioelectronics* 63: 72-79. https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.07.020.

Carlisi, D., B. Vassallo, M. Lauricella, S. Emanuele, A. D'Anneo, E. Di Leonardo, P. Di Fazio, R. Vento, et G. Tesoriere. 2008. « Histone Deacetylase Inhibitors Induce in Human Hepatoma HepG2 Cells Acetylation of P53 and Histones in Correlation with Apoptotic Effects ». *International Journal of Oncology*, janvier. https://doi.org/10.3892/ijo.32.1.177.

Carver, Kyle, Xin Ming, et Rudolph L. Juliano. 2014. « Multicellular tumor spheroids as a model for assessing delivery of oligonucleotides in three dimensions ». *Molecular Therapy - Nucleic Acids* 3 (March): e153. https://doi.org/10.1038/mtna.2014.5.

Casanova-Moreno, Jannu, Josiah To, Cheng Wei Tony Yang, Robin F.B. Turner, Dan Bizzotto, et Karen C. Cheung. 2017. « Fabricating Devices with Improved Adhesion between PDMS and Gold-Patterned Glass ». *Sensors and Actuators B: Chemical* 246 (juillet): 904-9. https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.02.109.

Chai, Huichao, Yongxiang Feng, Fei Liang, et Wenhui Wang. 2021. « A Microfluidic Device Enabling Deterministic Single Cell Trapping and Release ». *Lab on a Chip* 21 (13): 2486-94. https://doi.org/10.1039/D1LC00302J.

Chan, Hon Fai, Ying Zhang, Yi Ping Ho, Ya Ling Chiu, Youngmee Jung, et Kam W. Leong. 2013. « Rapid formation of multicellular spheroids in double-emulsion droplets with controllable microenvironment ». *Scientific Reports* 3: 1-8. https://doi.org/10.1038/srep03462.

Chen, T, F Artis, D Dubuc, J-J Fournié, M Poupot, et K Grenier. 2013. « Microwave Biosensor Dedicated to the Dielectric Spectroscopy of a Single Alive Biological Cell in Its Culture Medium », 1-4. https://doi.org/10.1109/MWSYM.2013.6697740.

Chen, T., F. Artis, D. Dubuc, J-J. Fournie, M. Poupot, et K. Grenier. 2013. « Microwave Biosensor Dedicated to the Dielectric Spectroscopy of a Single Alive Biological Cell in Its Culture Medium ». In *2013 IEEE MTT-S International Microwave Symposium (MTT)*, 1-4. Seattle, WA, USA: IEEE. https://doi.org/10.1109/MWSYM.2013.6697740.

Chen, Tong. 2012. « Développement de biocapteurs hyperfréquences microfluidiques pour la spectroscopie diélectrique non-invasine de la cellule unique. Application en cancérologie. » Toulouse: Université de Toulouse.

Chen, W., D. Dubuc, et K. Grenier. 2015. « Parametric Study of a Microwave Sensor Dedicated to the Dielectric Spectroscopy of Single Particles and Biological Cells ». In *2015 European Microwave Conference (EuMC)*, 829-32. Paris, France: IEEE. https://doi.org/10.1109/EuMC.2015.7345892.

CHEN, Wenli. 2016. « Spectroscopie diélectrique hyperfréquence de cellules uniques cancéreuses : de l'optimisation du capteur en sensibilité et répétabilité jusqu'au suivi en temps réel de stimuli chimiques ». Toulouse: Université de Toulouse.

Chew, Michelle, Soon Wee Ho, Nandar Su, Ebin Liao, Vempati Srinivas Rao, C.S. Premachandran, Rakesh Kumar, et Pinjala Damaruganath. 2009. « Development of Negative Profile of Dry Film Resist for Metal Lift off Process ». In *2009 11th Electronics Packaging Technology Conference*, 884-88. Singapore: IEEE. https://doi.org/10.1109/EPTC.2009.5416418.

Chiang, Ya-Yu, Yi-Chiuan Teng, Zhe-Yi Su, Han-Yu Hsueh, et Kai-Hung Tu. 2020. « Hydrodynamic Snaring Array for Trapping and Perfusion Culture of Single Cell ». *Sensors and Actuators B: Chemical* 312 (juin): 127966. https://doi.org/10.1016/j.snb.2020.127966.

Chien, Jun Chau, Ali Ameri, Erh Chia Yeh, Alison N. Killilea, Mekhail Anwar, et Ali M. Niknejad. 2018. « A high-throughput flow cytometry-on-a-CMOS platform for single-cell dielectric spectroscopy at microwave frequencies ». *Lab on a Chip* 18 (14): 2065-76. https://doi.org/10.1039/c8lc00299a.

Chien, Jun-Chau, Ali Ameri, Erh-Chia Yeh, Alison N. Killilea, Mekhail Anwar, et Ali M. Niknejad. 2018. « A High-Throughput Flow Cytometry-on-a-CMOS Platform for Single-Cell Dielectric Spectroscopy at Microwave Frequencies ». *Lab on a Chip* 18 (14): 2065-76. https://doi.org/10.1039/C8LC00299A.

Chiou, Pei Yu, Aaron T. Ohta, et Ming C. Wu. 2005. « Massively Parallel Manipulation of Single Cells and Microparticles Using Optical Images ». *Nature* 436 (7049): 370-72. https://doi.org/10.1038/nature03831.

Cho, Ming-Hsuang, Andrew Niles, Ruili Huang, James Inglese, Christopher P. Austin, Terry Riss, et Menghang Xia. 2008. « A Bioluminescent Cytotoxicity Assay for Assessment of Membrane Integrity Using a Proteolytic Biomarker ». *Toxicology in Vitro* 22 (4): 1099-1106. https://doi.org/10.1016/j.tiv.2008.02.013.

Choi, Jong Hoon, Lorena Loarca, Jose M. De Hoyos-Vega, Neda Dadgar, Kevin Loutherback, Vijay H. Shah, Gulnaz Stybayeva, et Alexander Revzin. 2020. « Microfluidic Confinement Enhances Phenotype and Function of Hepatocyte Spheroids ». *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 319 (3): C552-60. https://doi.org/10.1152/ajpcell.00094.2020.

Cole, Kenneth S., et Robert H. Cole. 1941. « Dispersion and absorption in dielectrics I. Alternating current characteristics ». *The Journal of Chemical Physics* 9 (4): 341-51. https://doi.org/10.1063/1.1750906.

Collins, Anna, Gareth J. Miles, Joanna Wood, Marion MacFarlane, Catrin Pritchard, et Esther Moss. 2020a. « Patient-derived explants, xenografts and organoids: 3-dimensional patient-relevant pre-clinical models in endometrial cancer ». *Gynecologic Oncology* 156 (1): 251-59. https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2019.11.020.

Collins, Anna, Gareth J Miles, Joanna Wood, Marion MacFarlane, Catrin Pritchard, et Esther Moss. 2020b. « Patient-Derived Explants, Xenografts and Organoids: 3-Dimensional Patient-Relevant Pre-Clinical Models in Endometrial Cancer ». *Gynecologic Oncology* 156 (1): 251-59. https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2019.11.020.

Collins, David J., Belinda Morahan, Jose Garcia-Bustos, Christian Doerig, Magdalena Plebanski, et Adrian Neild. 2015. « Two-Dimensional Single-Cell Patterning with One Cell per Well Driven by Surface Acoustic Waves ». *Nature Communications* 6 (1): 8686. https://doi.org/10.1038/ncomms9686.

Collins, David J., Adrian Neild, Andrew deMello, Ai-Qun Liu, et Ye Ai. 2015. « The Poisson Distribution and beyond: Methods for Microfluidic Droplet Production and Single Cell Encapsulation ». *Lab on a Chip* 15 (17): 3439-59. https://doi.org/10.1039/C5LC00614G.

Conger, A.D, et C. Z. Marvin. 1983. « Growth of Mammalian Multicellular Tumor Spheroids ». *Cancer Research* 43 (February): 556-60.

Costa, Elisabete C., André F. Moreira, Duarte de Melo-Diogo, Vítor M. Gaspar, Marco P. Carvalho, et Ilídio J. Correia. 2016. « 3D tumor spheroids: an overview on the tools and techniques used for their analysis ». *Biotechnology Advances* 34 (8): 1427-41. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.11.002.

Courson, R., S. Cargou, V. Conedera, M. Fouet, M. C. Blatche, C. L. Serpentini, et A. M. Gue. 2014. « Low-Cost Multilevel Microchannel Lab on Chip: DF-1000 Series Dry Film Photoresist as a Promising Enabler ». *RSC Adv.* 4 (97): 54847-53. https://doi.org/10.1039/C4RA09097G.

Curto, V. F., M. P. Ferro, F. Mariani, E. Scavetta, et R. M. Owens. 2018. « A Planar Impedance Sensor for 3D Spheroids ». *Lab on a Chip* 18 (6): 933-43. https://doi.org/10.1039/C8LC00067K.

Dadgar, Neda, Alan M. Gonzalez-Suarez, Pouria Fattahi, Xiaonan Hou, John S. Weroha, Alexandre Gaspar-Maia, Gulnaz Stybayeva, et Alexander Revzin. 2020. « A Microfluidic Platform for Cultivating Ovarian Cancer Spheroids and Testing Their Responses to Chemotherapies ». *Microsystems & Nanoengineering* 6 (1): 93. https://doi.org/10.1038/s41378-020-00201-6.

Daus, Andreas W., Michael Goldhammer, Paul G. Layer, et Christiane Thielemann. 2011. « Electromagnetic exposure of scaffold-free three-dimensional cell culture systems ». *Bioelectromagnetics* 32 (5): 351-59. https://doi.org/10.1002/bem.20649.

Daus, Andreas W., Paul G. Layer, et Christiane Thielemann. 2012. « A spheroid-based biosensor for the label-free detection of drug-induced field potential alterations ». *Sensors and Actuators, B: Chemical* 165 (1): 53-58. https://doi.org/10.1016/j.snb.2012.02.011.

Demicheli, Romano, Roberto Foroni, Antonella Ingrosso, Graziella Pratesi, Carla Soranzo, et Monica Tortoreto. 1989. « An Exponential-Gompertzian Description of LoVo Cell Tumor Growth from in Vivo and in Vitro Data ». *Cancer Research* 49 (23): 6543-46.

Demicheli, Romano, Graziella Prates, et Roberto Foroni. 1991. « The exponential-Gompertzian tumor Growth model data from six tumor cell lines in vitro and in vivo ». *Tumori* 77: 189-95.

Deng, Yilin, Ying Guo, et Bin Xu. 2020. « Recent Development of Microfluidic Technology for Cell Trapping in Single Cell Analysis: A Review ». *Processes* 8 (10): 1253. https://doi.org/10.3390/pr8101253.

Derick, Sylvain, Camille Gironde, Pierre Perio, Karine Reybier, Françoise Nepveu, Alain Jauneau, et Christophe Furger. 2017. « LUCS (Light-Up Cell System), a Universal High Throughput Assay for Homeostasis Evaluation in Live Cells ». *Scientific Reports* 7 (1): 18069. https://doi.org/10.1038/s41598-017-18211-2.

Desai, Salil P., Anthony Coston, et Andrew Berlin. 2019. « Micro-Electrical Impedance Spectroscopy and Identification of Patient-Derived, Dissociated Tumor Cells ». *IEEE Transactions on NanoBioscience* 18 (3): 369-72. https://doi.org/10.1109/TNB.2019.2920743.

Di Carlo, Dino. 2009. « Inertial Microfluidics ». *Lab on a Chip* 9 (21): 3038. https://doi.org/10.1039/b912547g.

Doh, Il, et Young-Ho Cho. 2005. « A Continuous Cell Separation Chip Using Hydrodynamic Dielectrophoresis (DEP) Process ». *Sensors and Actuators A: Physical* 121 (1): 59-65. https://doi.org/10.1016/j.sna.2005.01.030.

Du, Xiaotian, Caroline Ferguson, Xiao Ma, Xuanhong Cheng, et James C. M. Hwang. 2021. « Ultra-Wideband Impedance Spectroscopy of the Nucleus in a Live Cell ». *IEEE Journal of Electromagnetics, RF and Microwaves in Medicine and Biology*, 1-6. https://doi.org/10.1109/JERM.2021.3121258.

Dubuc, David, Katia Grenier, Florent Morfoisse, et Barbara Susini-Garmy. 2017. « In vitro and in vivo investigations toward near-field microwave-based detection of melanoma ». In *2017 First*

IEEE MTT-S International Microwave Bio Conference (IMBIOC), 1-4. Gothenburg, Sweden: IEEE. https://doi.org/10.1109/IMBIOC.2017.7965789.

Düchting, W., W. Ulmer, et T. Ginsberg. 1996. « Cancer: A challenge for control theory and computer modelling ». *European Journal of Cancer Part A* 32 (8): 1283-92. https://doi.org/10.1016/0959-8049(96)00075-5.

Ducommun, Bernard, Valérie Lobjois, Jennifer Laurent, Céline Frongia, Odile Mondesert, et Martine Cazales. 2013. « Multicellular tumor spheroid models to evaluate drugs targeting cell cycle checkpoints in 3D ». *BMC Cancer*, 4404-4404. https://doi.org/10.1158/1538-7445.am2013-4404.

Ebberg, Alfred, Jürgen Meggers, Kai Rathjen, Gerhard Fotheringham, Ivan Ndip, Florian Ohnimus, Christian Tschoban, et al. 2014. « Thin Glass Characterization in the Radio Frequency Range ». In *Ceramic Transactions Series*, édité par Jun Akedo, Tseung-Yuen Tseng, Xiang Ming Chen, et Hua-Tay Lin, 35-50. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc. https://doi.org/10.1002/9781118771402.ch4.

El Hasni, Akram, Carlo Schmitz, Katrin Bui-Göbbels, Peter Bräunig, Wilhelm Jahnen-Dechent, et Uwe Schnakenberg. 2017. « Electrical Impedance Spectroscopy of Single Cells in Hydrodynamic Traps ». *Sensors and Actuators B: Chemical* 248 (septembre): 419-29. https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.04.019.

Elje, Elisabeth, Michelle Hesler, Elise Rundén-Pran, Pascal Mann, Espen Mariussen, Sylvia Wagner, Maria Dusinska, et Yvonne Kohl. 2019. « The Comet Assay Applied to HepG2 Liver Spheroids ». *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 845 (septembre): 403033. https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2019.03.006.

Fattahi, Pouria, Ali Rahimian, Michael Q. Slama, Kihak Gwon, Alan M. Gonzalez-Suarez, Jadon Wolf, Harihara Baskaran, et al. 2021. « Core–Shell Hydrogel Microcapsules Enable Formation of Human Pluripotent Stem Cell Spheroids and Their Cultivation in a Stirred Bioreactor ». *Scientific Reports* 11 (1): 7177. https://doi.org/10.1038/s41598-021-85786-2.

Fedi, Arianna, Chiara Vitale, Paolo Giannoni, Guido Caluori, et Alessandra Marrella. 2022. « Biosensors to Monitor Cell Activity in 3D Hydrogel-Based Tissue Models ». *Sensors* 22 (4). https://doi.org/10.3390/s22041517.

Feng, Yongxiang, Liang Huang, Peng Zhao, Fei Liang, et Wenhui Wang. 2019. « A Microfluidic Device Integrating Impedance Flow Cytometry and Electric Impedance Spectroscopy for High-Efficiency Single-Cell Electrical Property Measurement ». *Analytical Chemistry* 91 (23): 15204-12. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b04083.

Fennema, Eelco, Nicolas Rivron, Jeroen Rouwkema, Clemens van Blitterswijk, et Jan de Boer. 2013. « Spheroid Culture as a Tool for Creating 3D Complex Tissues ». *Trends in Biotechnology* 31 (2): 108-15. https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2012.12.003.

Forkink, Marleen, Peter H. G. M. Willems, Werner J. H. Koopman, et Sander Grefte. 2015. « Live-Cell Assessment of Mitochondrial Reactive Oxygen Species Using Dihydroethidine ». In *Mitochondrial Medicine*, édité par Volkmar Weissig et Marvin Edeas, 1264:161-69. Methods in Molecular Biology. New York, NY: Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2257-4_15.

Fory, U., et M. Bodnar. 2003. « Time delays in proliferation process for solid avascular tumour ». *Mathematical and Computer Modelling* 37 (11): 1201-9. https://doi.org/10.1016/S0895-7177(03)80019-5.

Foty, Ramsey. 2011. « A simple hanging drop cell culture protocol for generation of 3D spheroids ». *Journal of Visualized Experiments*, n° 51: 2-6. https://doi.org/10.3791/2720.

Fraga, Dean, Tea Meulia, et Steven Fenster. 2008. « Real-time PCR ». *Current Protocols Essential Laboratory Techniques*, n° 10.3. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-289-2_1.

Frankman, Zachary D., Linan Jiang, Joyce A. Schroeder, et Yitshak Zohar. 2022. « Application of Microfluidic Systems for Breast Cancer Research ». *Micromachines* 13 (2). https://doi.org/10.3390/mi13020152.

Frey, Tom, Stephen Yue, et Richard P. Haugland. 1995. « Dyes Providing Increased Sensitivity in Flow-Cytometric Dye-Efflux Assays for Multidrug Resistance ». *Cytometry* 20 (3): 218-27. https://doi.org/10.1002/cyto.990200305.

Frimat, Jean-Philippe, Marco Becker, Ya-Yu Chiang, Ulrich Marggraf, Dirk Janasek, Jan G. Hengstler, Joachim Franzke, et Jonathan West. 2011. « A Microfluidic Array with Cellular Valving for Single Cell Co-Culture ». *Lab Chip* 11 (2): 231-37. https://doi.org/10.1039/C0LC00172D.

Furger, Christophe. 2016. *Live Cell Assays: From Research to Regalatory Applications*. John Wiley&Sons. Hoboken. New Jersey, USA.

Gabriel, C., S. Gabriel, et E. Corthout. 1996. « The dielectric properties of biological tissues: I. Literature survey ». *Physics in Medicine and Biology* 41 (11): 2231-49. https://doi.org/10.1088/0031-9155/41/11/001.

Gajasinghe, R W R L, S U Senveli, S Rawal, A Williams, A Zheng, R H Datar, R J Cote, et O Tigli. 2014. « Experimental Study of PDMS Bonding to Various Substrates for Monolithic Microfluidic Applications ». *Journal of Micromechanics and Microengineering* 24 (7): 075010. https://doi.org/10.1088/0960-1317/24/7/075010.

Gerasimenko, Tatiana, Sergey Nikulin, Galina Zakharova, Andrey Poloznikov, Vladimir Petrov, Ancha Baranova, et Alexander Tonevitsky. 2020. « Impedance Spectroscopy as a Tool for Monitoring Performance in 3D Models of Epithelial Tissues ». *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 7 (January). https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00474.

Ghalichechian, Nima. 2015. « Permittivity and Loss Characterization of SU-8 Films for MmW and Terahertz Applications ». *IEEE ANTENNAS AND WIRELESS PROPAGATION LETTERS* 14: 4.

Gironde, C., C. Dufour, et C. Furger. 2020. « Use of LUCS (Light-Up Cell System) as an Alternative Live Cell Method to Predict Human Acute Oral Toxicity ». *Toxicology Reports* 7: 403-12. https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2020.02.010.

Gironde, C., Mylène Rigal, Cécile Dufour, et Christophe Furger. 2020. « AOP1, a New Live Cell Assay for the Direct and Quantitative Measure of Intracellular Antioxidant Effects ». *Antioxidants* 9 (6): 471. https://doi.org/10.3390/antiox9060471.

González, Jesús E., et Michael P. Maher. 2002. « Cellular Fluorescent Indicators and Voltage/Ion Probe Reader (VIPR TM): Tools for Ion Channel and Receptor Drug Discovery ». *Receptors and Channels* 8 (5-6): 283-95. https://doi.org/10.3109/10606820214644.

Grenier, Katia, Francois Artis, Mary Poupot, J-J. Foumie, et David Dubuc. 2018. « Label-free discrimination of human lymphoma cell sub-populations with microwave dielectric spectroscopy ». In *2018 IEEE/MTT-S International Microwave Symposium - IMS*, 907-10. Philadelphia, PA: IEEE. https://doi.org/10.1109/MWSYM.2018.8439472.

Grenier, Katia, David Dubuc, Tong Chen, Francois Artis, Thomas Chretiennot, Mary Poupot, et Jean Jacques Fournie. 2013. « Recent advances in microwave-based dielectric spectroscopy at the cellular level for cancer investigations ». *IEEE Transactions on Microwave Theory and Techniques* 61 (5): 2023-30. https://doi.org/10.1109/TMTT.2013.2255885.

Grenier, Katia, David Dubuc, Paul-Emile Poleni, Momoko Kumemura, Hiroshi Toshiyoshi, Teruo Fujii, et Hiroyuki Fujita. 2009. « Integrated Broadband Microwave and Microfluidic Sensor Dedicated to Bioengineering ». *IEEE TRANSACTIONS ON MICROWAVE THEORY AND TECHNIQUES* 57 (12): 8.

Halldorsson, Skarphedinn, Edinson Lucumi, Rafael Gómez-Sjöberg, et Ronan M.T. Fleming. 2015. « Advantages and Challenges of Microfluidic Cell Culture in Polydimethylsiloxane Devices ». *Biosensors and Bioelectronics* 63 (janvier): 218-31. https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.07.029.

Han, Song-I, et Ki-Ho Han. 2015. « Electrical Detection Method for Circulating Tumor Cells Using Graphene Nanoplates ». *Analytical Chemistry* 87 (20): 10585-92. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b03147.

Hayakawa, Takeshi, Shinya Sakuma, et Fumihito Arai. 2015. « On-Chip 3D Rotation of Oocyte Based on a Vibration-Induced Local Whirling Flow ». *Microsystems & Nanoengineering* 1 (1): 15001. https://doi.org/10.1038/micronano.2015.1.

Heileman, Khalil, Jamal Daoud, et Maryam Tabrizian. 2013. « Dielectric spectroscopy as a viable biosensing tool for cell and tissue characterization and analysis ». *Biosensors and Bioelectronics* 49: 348-59. https://doi.org/10.1016/j.bios.2013.04.017.

Herold, Christoph, Marion Ganslmayer, Matthias Ocker, Martin Hermann, Albert Geerts, Eckhart G Hahn, et Detlef Schuppan. 2002. « The Histone-Deacetylase Inhibitor Trichostatin A Blocks Proliferation and Triggers Apoptotic Programs in Hepatoma Cells ». *Journal of Hepatology* 36 (2): 233-40. https://doi.org/10.1016/S0168-8278(01)00257-4.

Hong, Jhih-Lin, Kung-Chieh Lan, et Ling-Sheng Jang. 2012. « Electrical Characteristics Analysis of Various Cancer Cells Using a Microfluidic Device Based on Single-Cell Impedance Measurement ». *Sensors and Actuators B: Chemical* 173 (octobre): 927-34. https://doi.org/10.1016/j.snb.2012.06.046.

Hsiao, Amy Y., Yu-suke Torisawa, Yi-Chung Tung, Sudha Sud, Russell S. Taichman, Kenneth J. Pienta, et Shuichi Takayama. 2009. « Microfluidic System for Formation of PC-3 Prostate Cancer Co-Culture Spheroids ». *Biomaterials* 30 (16): 3020-27. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.02.047.

Huebner, Ansgar, Sanjiv Sharma, Monpichar Srisa-Art, Florian Hollfelder, Joshua B. Edel, et Andrew J. deMello. 2008. « Microdroplets: A Sea of Applications? » *Lab on a Chip* 8 (8): 1244. https://doi.org/10.1039/b806405a.

Huh, Yang O., et Sherif Ibrahim. 2000. « IMMUNOPHENOTYPES IN ADULT ACUTE LYMPHOCYTIC LEUKEMIA ». *Hematology/Oncology Clinics of North America* 14 (6): 1251-65. https://doi.org/10.1016/S0889-8588(05)70185-4.

Hyodo, F., S. Matsumoto, E. Hyodo, A. Matsumoto, K. Matsumoto, et M.C. Krihna. 2010. « In vivo measurement of tissue Oxygen using electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy with Oxygen-Sensitive Paramagnetic Particle, Lithium Phthalocyanine ». *Methods in Molecular Biology* 610 (2): 29-39. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-029-8.

Ito, Keitaro, Shinya Sakuma, Masaki Kimura, Takanori Takebe, Makoto Kaneko, et Fumihito Arai. 2016. « Temporal transition of mechanical characteristics of HUVEC/MSC spheroids using a microfluidic chip with force sensor probes ». *Micromachines* 7 (12). https://doi.org/10.3390/mi7120221.

Ivascu, Andrea, et Manfred Kubbies. 2006. « Rapid generation of single-tumor spheroids for high-throughput cell function and toxicity analysis ». *Journal of Biomolecular Screening* 11 (8): 922-32. https://doi.org/10.1177/1087057106292763.

Järvinen, Päivi, Ashkan Bonabi, Ville Jokinen, et Tiina Sikanen. 2020. « Simultaneous Culturing of Cell Monolayers and Spheroids on a Single Microfluidic Device for Bridging the Gap between 2D and 3D Cell Assays in Drug Research ». *Advanced Functional Materials* 30 (19): 2000479. https://doi.org/10.1002/adfm.202000479.

Jin, D., B. Deng, J. X. Li, W. Cai, L. Tu, J. Chen, Q. Wu, et W. H. Wang. 2015. « A Microfluidic Device Enabling High-Efficiency Single Cell Trapping ». *Biomicrofluidics* 9 (1): 014101. https://doi.org/10.1063/1.4905428.

Jin, Hye-Jin, Young-Ho Cho, Jin-Mo Gu, Jhingook Kim, et Yong-Soo Oh. 2011. « A Multicellular Spheroid Formation and Extraction Chip Using Removable Cell Trapping Barriers ». *Lab Chip* 11 (1): 115-19. https://doi.org/10.1039/C0LC00134A.

Judson, Richard, Robert Kavlock, Matthew Martin, David Reif, Keith Houck, Thomas Knudsen, Ann Richard, et al. 2013. « Perspectives on Validation of High-Throughput Assays Supporting 21st Century Toxicity Testing ». *ALTEX* 30 (1): 51-56. https://doi.org/10.14573/altex.2013.1.051.

Kapałczyńska, Marta, Tomasz Kolenda, Weronika Przybyła, Maria Zajączkowska, Anna Teresiak, Violetta Filas, Matthew Ibbs, Renata Bliźniak, Łukasz Łuczewski, et Katarzyna Lamperska.

2016. « 2D and 3D cell cultures – a comparison of different ». *Archives of Medical Science* 14 (4): 910-19.

Keloth, Anusha, Owen Anderson, Donald Risbridger, et Lynn Paterson. 2018. « Single Cell Isolation Using Optical Tweezers ». Preprint. PHYSICAL SCIENCES. https://doi.org/10.20944/preprints201806.0371.v1.

Kessel, Sarah, Scott Cribbes, Olivier Déry, Dmitry Kuksin, Eric Sincoff, Jean Qiu, et Leo Li Ying Chan. 2017. « High-Throughput 3D Tumor Spheroid Screening Method for Cancer Drug Discovery Using Celigo Image Cytometry ». *SLAS Technology* 22 (4): 454-65. https://doi.org/10.1177/2211068216652846.

Keysight Technologies. 2022. « Basics of Measuring the Dielectric Properties of Materials ». Keysight Technologies.

Khaitan, Divya, Sudhir Chandna, M. B. Arya, et B. S. Dwarakanath. 2006. « Establishment and characterization of multicellular spheroids from a human glioma cell line; implications for tumor therapy ». *Journal of Translational Medicine* 4: 1-13. https://doi.org/10.1186/1479-5876-4-12.

Khot, Ibrahim M., M.A. Levensein, N. Kapur, et David G. Jayne. 2019. « A reviex on the recent Advancement in "Tumour Spheroids-on-a-Chip" ». *Journal of Cancer Research and Practice* 6 (1): 1. https://doi.org/10.4103/JCRP.JCRP.

Kim, Jin Young, David A. Fluri, Rosemarie Marchan, Kurt Boonen, Soumyaranjan Mohanty, Prateek Singh, Seddik Hammad, et al. 2015. « 3D spherical microtissues and microfluidic technology for multi-tissue experiments and analysis ». *Journal of Biotechnology* 205: 24-35. https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2015.01.003.

Kim, Jin-Young, David A. Fluri, Rosemarie Marchan, Kurt Boonen, Soumyaranjan Mohanty, Prateek Singh, Seddik Hammad, et al. 2015. « 3D Spherical Microtissues and Microfluidic Technology for Multi-Tissue Experiments and Analysis ». *Journal of Biotechnology* 205 (juillet): 24-35. https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2015.01.003.

Kim, Woosung, Şahin Kaya Özdemir, Jiangang Zhu, Lina He, et Lan Yang. 2010. « Demonstration of Mode Splitting in an Optical Microcavity in Aqueous Environment ». *Applied Physics Letters* 97 (7): 071111. https://doi.org/10.1063/1.3481352.

Kloß, Daniel, Randy Kurz, Heinz Georg Jahnke, Michael Fischer, Andrée Rothermel, Ulf Anderegg, Jan C. Simon, et Andrea A. Robitzki. 2008. « Microcavity array (MCA)-based biosensor chip for functional drug screening of 3D tissue models ». *Biosensors and Bioelectronics* 23 (10): 1473-80. https://doi.org/10.1016/j.bios.2008.01.003.

Kull, Frederick C., et Pedro Cuatrecasas. 1983. « Estimation of Cell Number by Neutral Red Content: Applications for Proliferative and Survival Assays ». *Applied Biochemistry and Biotechnology* 8 (2): 97-103. https://doi.org/10.1007/BF02778090.

Kurakazu, Tomoaki, Kaori Kuribayashi-Shigetomi, Yukiko T. Matsunaga, Hiroshi Kimura, Teruo Fujii, Yasuyuki Sakai, et Shoji Takeuchi. 2011. « Selective Retrieval of Microparticles in Microchambers Using Electrolytically Generated Bubbles for Cell Array Applications ». *Sensors and Actuators B: Chemical* 159 (1): 229-33. https://doi.org/10.1016/j.snb.2011.06.077.

Kwapiszewska, K., A. Michalczuk, M. Rybka, R. Kwapiszewski, et Z. Brzózka. 2014. « A microfluidic-based platform for tumour spheroid culture, monitoring and drug screening ». *Lab on a Chip* 14 (12): 2096-2104. https://doi.org/10.1039/c4lc00291a.

Lambert, Elisa, Elodie Barthout, Remi Manczak, Sofiane Saada, Muriel Mathonnet, Barbara Bessette, Claire Dalmay, Fabrice Lalloue, et Arnaud Pothier. 2022. « Ultra High Frequency Dielectrophoresis Manipulation to Monitor the Kinetics of Glioblastoma Cells Stemness Phenotype Acquirement ». In *2022 IEEE MTT-S International Microwave Biomedical Conference (IMBioC)*, 19-21. Suzhou, China: IEEE. https://doi.org/10.1109/IMBioC52515.2022.9790189.

Langan, Laura M., Nicholas J.F. Dodd, Stewart F. Owen, Wendy M. Purcell, Simon K. Jackson, et Awadhesh N. Jha. 2016. « Direct measurements of oxygen gradients in spheroid culture system using electron parametric resonance oximetry ». *PLoS ONE* 11 (2): 1-13. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149492.

Langer, Krzysztof, et Haakan N. Joensson. 2020. « Rapid Production and Recovery of Cell Spheroids by Automated Droplet Microfluidics ». *SLAS Technology* 25 (2): 111-22. https://doi.org/10.1177/2472630319877376.

Lazebnik, Mariya, Ernest L Madsen, Gary R Frank, et Susan C Hagness. 2005. « Tissue-Mimicking Phantom Materials for Narrowband and Ultrawideband Microwave Applications ». *Physics in Medicine and Biology* 50 (18): 4245-58. https://doi.org/10.1088/0031-9155/50/18/001.

Lazebnik, Mariya, Dijana Popovic, Leah McCartney, Cynthia B. Watkins, Mary J. Lindstrom, Josephine Harter, Sarah Sewall, et al. 2007. « A large-scale study of the ultrawideband microwave dielectric properties of normal, benign and malignant breast tissues obtained from cancer surgeries ». *Physics in Medicine and Biology* 52 (20): 6093-6115. https://doi.org/10.1088/0031-9155/52/20/002.

Lee, Dongjin, et Chaenyung Cha. 2020. « Cell Subtype-Dependent Formation of Breast Tumor Spheroids and Their Variable Responses to Chemotherapeutics within Microfluidics-Generated 3D Microgels with Tunable Mechanics ». *Materials Science and Engineering: C* 112 (juillet): 110932. https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.110932.

Lee, Jong Min, Ji Wook Choi, Christian D. Ahrberg, Hyung Woo Choi, Jang Ho Ha, Seok Gyu Mun, Sung Joon Mo, et Bong Geun Chung. 2020. « Generation of Tumor Spheroids Using a Droplet-Based Microfluidic Device for Photothermal Therapy ». *Microsystems & Nanoengineering* 6 (1): 52. https://doi.org/10.1038/s41378-020-0167-x.

Lee, Sang Woo, Soyoung Hong, Boyoung Jung, Soo Yeon Jeong, Jae Hee Byeon, Gi Seok Jeong, Jaesoon Choi, et Changmo Hwang. 2019. « In Vitro Lung Cancer Multicellular Tumor Spheroid Formation Using a Microfluidic Device ». *Biotechnology and Bioengineering* 116 (11): 3041-52. https://doi.org/10.1002/bit.27114.

Lee, Sun Mi, Nalae Han, Rimi Lee, In Hong Choi, Yong Beom Park, Jeon Soo Shin, et Kyung Hwa Yoo. 2016. « Real-time monitoring of 3D cell culture using a 3D capacitance biosensor ». *Biosensors and Bioelectronics* 77: 56-61. https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.09.005.

Lighthill, Sir James. 1978. « Acoustic Streaming ». *Journal of Sound and Vibration* 61 (3): 391-418. https://doi.org/10.1016/0022-460X(78)90388-7.

Liu, Chia-Feng, Min-Haw Wang, et Ling-Sheng Jang. 2018. « Microfluidics-Based Hairpin Resonator Biosensor for Biological Cell Detection ». *Sensors and Actuators B: Chemical* 263 (juin): 129-36. https://doi.org/10.1016/j.snb.2018.01.234.

Liu, Hui, Tao Lu, Gert Jan Kremers, Ann L.B. Seynhaeve, et Timo L.M. Ten Hagen. 2020. « A microcarrier-based spheroid 3D invasion assay to monitor dynamic cell movement in extracellular matrix ». *Biological Procedures Online* 22 (1): 1-12. https://doi.org/10.1186/s12575-019-0114-0.

Liu, Xiaoming, Qing Shi, Yuqing Lin, Masaru Kojima, Yasushi Mae, Qiang Huang, Toshio Fukuda, et Tatsuo Arai. 2018. « Vortex-Driven Rotation for Three-Dimensional Imaging Under Microscopy ». *IEEE Transactions on Nanotechnology* 17 (4): 688-91. https://doi.org/10.1109/TNANO.2018.2811958.

Liu, Yang, Dahai Ren, Xixin Ling, Weibin Liang, Jing Li, Zheng You, Yaxiaer Yalikun, et Yo Tanaka. 2018. « Time Sequential Single-Cell Patterning with High Efficiency and High Density ». *Sensors* 18 (11): 3672. https://doi.org/10.3390/s18113672.

Loessner, Daniela, Simone C. Rizzi, Kathryn S. Stok, Tobias Fuehrmann, Brett Hollier, Viktor Magdolen, Dietmar W. Hutmacher, et Judith A. Clements. 2013. « A bioengineered 3D ovarian cancer model for the assessment ofpeptidase-mediated enhancement of spheroid growth andintraperitoneal spread ». *Biomaterials* 34 (30): 7389-7400. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.06.009.

Lorenzo, Jose A.Martinez, Antonio Basukoski, Fernando Quivira, Carey M. Rappaport, Richard Moore, et Daniel B. Kopans. 2013. « Composite models for microwave dielectric constant characterization of breast tissues ». *IEEE Antennas and Propagation Society, AP-S International Symposium (Digest)*, 2036-37. https://doi.org/10.1109/APS.2013.6711676.

Luo, Tao, Lei Fan, Rong Zhu, et Dong Sun. 2019. « Microfluidic Single-Cell Manipulation and Analysis: Methods and Applications ». *Micromachines* 10 (2): 104. https://doi.org/10.3390/mi10020104.

Mahhengam, Negah, Ali fahem ghetran Khazaali, Surendar Aravindhan, Angelina Olegovna Zekiy, Lyubov Melnikova, et Homayoon Siahmansouri. 2021. « Applications of Microfluidic Devices in the Diagnosis and Treatment of Cancer: A Review Study ». *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, mai, 1-15. https://doi.org/10.1080/10408347.2021.1922870.

Mahmood, Tahrin, et Ping Chang Yang. 2012. « Western blot: Technique, theory, and trouble shooting ». *North American Journal of Medical Sciences* 4 (9): 429-34. https://doi.org/10.4103/1947-2714.100998.

Marhuenda, Emilie, Christine Fabre, Cunjie Zhang, Martà Martin-Fernandez, Thomas Iskratsch, Ali Saleh, Luc Bauchet, et al. 2021. « Glioma Stem Cells Invasive Phenotype at Optimal Stiffness Is Driven by MGAT5 Dependent Mechanosensing ». *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 40 (1): 139. https://doi.org/10.1186/s13046-021-01925-7.

McGrath, J.S., C. Honrado, J.H. Moore, S.J. Adair, W.B. Varhue, A. Salahi, V. Farmehini, et al. 2020. « Electrophysiology-Based Stratification of Pancreatic Tumorigenicity by Label-Free Single-Cell Impedance Cytometry ». *Analytica Chimica Acta* 1101 (mars): 90-98. https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.12.033.

McMillan, Kay S., Marie Boyd, et Michele Zagnoni. 2016. « Transitioning from Multi-Phase to Single-Phase Microfluidics for Long-Term Culture and Treatment of Multicellular Spheroids ». *Lab on a Chip* 16 (18): 3548-57. https://doi.org/10.1039/C6LC00884D.

Mehrotra, Parikha, Baibhab Chatterjee, et Shreyas Sen. 2019. « EM-Wave Biosensors: A Review of RF, Microwave, Mm-Wave and Optical Sensing ». *Sensors* 19 (5): 1013. https://doi.org/10.3390/s19051013.

Meyne, Nora, Grischa Fuge, An-Ping Zeng, et Arne F. Jacob. 2017. « Resonant Microwave Sensors for Picoliter Liquid Characterization and Nondestructive Detection of Single Biological Cells ». *IEEE Journal of Electromagnetics, RF and Microwaves in Medicine and Biology* 1 (2): 98-104. https://doi.org/10.1109/JERM.2017.2787479.

Mi, Lu, Liang Huang, Junxiang Li, Guoqiang Xu, Qiong Wu, et Wenhui Wang. 2016. « A Fluidic Circuit Based, High-Efficiency and Large-Scale Single Cell Trap ». *Lab on a Chip* 16 (23): 4507-11. https://doi.org/10.1039/C6LC01120A.

Misun, Patrick M., Jörg Rothe, Yannick R.F. Schmid, Andreas Hierlemann, et Olivier Frey. 2016. « Multi-analyte biosensor interface for real-time monitoring of 3D microtissue spheroids in hanging-drop networks ». *Microsystems and Nanoengineering* 2 (October 2015). https://doi.org/10.1038/micronano.2016.22.

Mollo, Valentina, Paola Scognamiglio, Attilio Marino, Gianni Ciofani, et Francesca Santoro. 2020. « Probing the Ultrastructure of Spheroids and Their Uptake of Magnetic Nanoparticles by FIB–SEM ». *Advanced Materials Technologies* 5 (3): 1-7. https://doi.org/10.1002/admt.201900687.

Molloy, Justin E., Kishan Dholakia, et Miles J. Padgett. 2003. « Optical Tweezers in a New Light ». *Journal of Modern Optics* 50 (10): 1501-7. https://doi.org/10.1080/0950034030823522 4.

Morgan, Hywel, Tao Sun, David Holmes, Shady Gawad, et Nicolas G Green. 2007. « Single Cell Dielectric Spectroscopy ». *Journal of Physics D: Applied Physics* 40 (1): 61-70. https://doi.org/10.1088/0022-3727/40/1/S10.

Moshksayan, Khashayar, Navid Kashaninejad, Majid Ebrahimi Warkiani, John G. Lock, Hajar Moghadas, Bahar Firoozabadi, Mohammad Said Saidi, et Nam-Trung Nguyen. 2018. « Spheroids-on-a-Chip: Recent Advances and Design Considerations in Microfluidic Platforms

for Spheroid Formation and Culture ». *Sensors and Actuators B: Chemical* 263 (juin): 151-76. https://doi.org/10.1016/j.snb.2018.01.223.

Mulholland, Theresa, Milly McAllister, Samantha Patek, David Flint, Mark Underwood, Alexander Sim, Joanne Edwards, et Michele Zagnoni. 2018. « Drug screening of biopsy-derived spheroids using a self-generated microfluidic concentration gradient ». *Scientific Reports* 8 (1): 1-12. https://doi.org/10.1038/s41598-018-33055-0.

Mullock, Barbara M, et J Paul Luzio. 2000. « Theory of Organelle Biogenesis : A Historical Perspective ». *The Biogenesis of Cellular Organelles*, 1-18.

Munaz, Ahmed, Muhammad J. A. Shiddiky, et Nam-Trung Nguyen. 2018. « Recent Advances and Current Challenges in Magnetophoresis Based Micro Magnetofluidics ». *Biomicrofluidics* 12 (3): 031501. https://doi.org/10.1063/1.5035388.

Narayanamurthy, Vigneswaran, Sairam Nagarajan, Al'aina Yuhainis Firus Khan, Fahmi Samsuri, et T. M. Sridhar. 2017. « Microfluidic Hydrodynamic Trapping for Single Cell Analysis: Mechanisms, Methods and Applications ». *Analytical Methods* 9 (25): 3751-72. https://doi.org/10.1039/C7AY00656J.

Nath, Sritama, et Gayathri R. Devi. 2016. « Three-dimensional culture systems in cancer research: Focus on tumor spheroid model ». *Pharmacology and Therapeutics* 163: 94-108. https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2016.03.013.

Nerguizian, Vahé, Anas Alazzam, Ion Stiharu, et Miguel Burnier. 2017. « Characterization of Several Cancer Cell Lines at Microwave Frequencies ». *Measurement* 109 (octobre): 354-58. https://doi.org/10.1016/j.measurement.2017.05.057.

Nguyen, Tien Anh, Tsung-I Yin, Diego Reyes, et Gerald A. Urban. 2013. « Microfluidic Chip with Integrated Electrical Cell-Impedance Sensing for Monitoring Single Cancer Cell Migration in Three-Dimensional Matrixes ». *Analytical Chemistry* 85 (22): 11068-76. https://doi.org/10.1021/ac402761s.

Nishimura, Keigo, Minghao Nie, et Shoji Takeuchi. 2020. « 3D Microfluidic Device for Perfusion Culture of Spheroids ». In *2020 IEEE 33rd International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (MEMS)*, 998-1001. Vancouver, BC, Canada: IEEE. https://doi.org/10.1109/MEMS46641.2020.9056442.

Nunes, Ana S., Andreia S. Barros, Elisabete C. Costa, André F. Moreira, et Ilídio J. Correia. 2019. « 3D tumor spheroids as in vitro models to mimic in vivo human solid tumors resistance to therapeutic drugs ». *Biotechnology and Bioengineering* 116 (1): 206-26. https://doi.org/10.1002/bit.26845.

Nurse, Paul, et Jacqueline Hayles. 2011. « The Cell in an Era of Systems Biology ». *Cell* 144 (6): 850-54. https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.045.

Nurunnabi, Md, Zehedina Khatun, Vishnu Revuri, Md Nafiujjaman, Seungbin Cha, Sungpil Cho, Kang Moo Huh, et Yong-kyu Lee. 2016. « Design and Strategies for Bile Acid Mediated Therapy and Imaging ». *RSC Advances* 6 (78): 73986-2. https://doi.org/10.1039/C6RA10978K.

O'Rourke, Ann P., Mariya Lazebnik, John M. Bertram, Mark C. Converse, Susan C. Hagness, John G. Webster, et David M. Mahvi. 2007. « Dielectric properties of human normal, malignant and cirrhotic liver tissue: In vivo and ex vivo measurements from 0.5 to 20 GHz using a precision open-ended coaxial probe ». *Physics in Medicine and Biology* 52 (15): 4707-19. https://doi.org/10.1088/0031-9155/52/15/022.

Ostermann, Melanie, Alexander Sauter, Ying Xue, Eivind Birkeland, Julia Schoelermann, Bodil Holst, et Mihaela Roxana Cimpan. 2020. « Label-Free Impedance Flow Cytometry for Nanotoxicity Screening ». *Scientific Reports* 10 (1): 142. https://doi.org/10.1038/s41598-019-56705-3.

Ota, Hiroki, et Norihisa Miki. 2011. « Microfluidic experimental platform for producing size-controlled three-dimensional spheroids ». *Sensors and Actuators, A: Physical* 169 (2): 266-73. https://doi.org/10.1016/j.sna.2011.03.051.

Otsuka, H., T. Satomi, A. Hirano, Y. Nagasaki, et K. Kataoka. 2005. « Two-dimensional array formation of multi-cellular spheroids on micro-patterned polymer brush surface ». *Key Engineering Materials* 288-289: 449-52. https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/KEM.288-289.449.

Pan, Yuxiang, Ning Hu, Xinwei Wei, Lin Gong, Bin Zhang, Hao Wan, et Ping Wang. 2019. « 3D cell-based biosensor for cell viability and drug assessment by 3D electric cell/matrigel-substrate impedance sensing ». *Biosensors and Bioelectronics* 130 (July 2018): 344-51. https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.09.046.

Pandya, Hardik J., Hyun Tae Kim, Rajarshi Roy, Wenjin Chen, Lei Cong, Hua Zhong, David J. Foran, et Jaydev P. Desai. 2014. « Towards an automated MEMS-based characterization of benign and cancerous breast tissue using bioimpedance measurements ». *Sensors and Actuators, B: Chemical* 199: 259-68. https://doi.org/10.1016/j.snb.2014.03.065.

Park, Yangkyu, Hyeon Woo Kim, Joho Yun, Seungwan Seo, Chang-Ju Park, Jeong Zoo Lee, et Jong-Hyun Lee. 2016. « Microelectrical Impedance Spectroscopy for the Differentiation between Normal and Cancerous Human Urothelial Cell Lines: Real-Time Electrical Impedance Measurement at an Optimal Frequency ». *BioMed Research International* 2016: 1-10. https://doi.org/10.1155/2016/8748023.

Parodi, Alessandro, Roberto Molinaro, Manuela Sushnitha, Michael Evangelopoulos, Jonathan O. Martinez, Noemi Arrighetti, Claudia Corbo, et Ennio Tasciotti. 2017. « Bio-Inspired Engineering of Cell- and Virus-like Nanoparticles for Drug Delivery ». *Biomaterials* 147 (décembre): 155-68. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.09.020.

Pérard, Matthieu, Justine Le Clerc, Fleur Meary, Fabienne Pérez, Sylvie Tricot-Doleux, et Pascal Pellen-Mussi. 2013. « Spheroid model study comparing the biocompatibility of Biodentine and MTA ». *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 24 (6): 1527-34. https://doi.org/10.1007/s10856-013-4908-3.

Petchakup, Chayakorn, King Li, et Han Hou. 2017. « Advances in Single Cell Impedance Cytometry for Biomedical Applications ». *Micromachines* 8 (3): 87. https://doi.org/10.3390/mi8030087.

Peytral-Rieu, Olivia, David Dubuc, et Katia Grenier. 2022. « Microwave Microfabricated Sensor Dedicated to the Dielectric Characterization of Biological Microtissues ». In *2022 URSI AT-AP-RASC, Atlantic Radio Science Meeting*, 3-6. Gran Canaria: IEEE.

Peytral-Rieu, Olivia, Katia Grenier, et David Dubuc. 2021. « Microwave Sensor Dedicated to the Determination of the Dielectric Properties of 3D Biological Models from 500MHz to 20GHz ». In *2021 IEEE MTT-S International Microwave Symposium (IMS)*, 4. Atlanta, GA: IEEE.

Pinto, Bárbara, Ana C. Henriques, Patrícia M.A. Silva, et Hassan Bousbaa. 2020. « Three-dimensional spheroids as in vitro preclinical models for cancer research ». *Pharmaceutics* 12 (12): 1-38. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12121186.

Poiroux, Guillaume, David Dubuc, Mohsen Hosseini, François Artis, Amar Tamra, Marie Tosolini, Frédéric Pont, et al. 2020. « Label-Free Detection of Mitochondrial Activity with Microwave Dielectric Spectroscopy Research Article ». *International Journal of Biotechnology and Bioengineering* 6 (5): 15.

Powley, Ian R., Meeta Patel, Gareth Miles, Howard Pringle, Lynne Howells, Anne Thomas, Catherine Kettleborough, et al. 2020. « Patient-Derived Explants (PDEs) as a Powerful Preclinical Platform for Anti-Cancer Drug and Biomarker Discovery ». *British Journal of Cancer* 122 (6): 735-44. https://doi.org/10.1038/s41416-019-0672-6.

Pozar, David, M. 2012. *Microwave Engineering, 4th edition*. John Wiley&Sons, Inc.

Prunkl, Christa, Sina Berndl, Claudia Wanninger-Weiß, Janez Barbaric, et Hans-Achim Wagenknecht. 2010. « Photoinduced Short-Range Electron Transfer in DNA with Fluorescent DNA Bases: Lessons from Ethidium and Thiazole Orange as Charge Donors ». *Phys. Chem. Chem. Phys.* 12 (1): 32-43. https://doi.org/10.1039/B914487K.

Raj M, Kiran, et Suman Chakraborty. 2020. « PDMS Microfluidics: A Mini Review ». *Journal of Applied Polymer Science* 137 (27): 48958. https://doi.org/10.1002/app.48958.

Ramaiahgari, Sreenivasa C., Michiel W. den Braver, Bram Herpers, Valeska Terpstra, Jan N. M. Commandeur, Bob van de Water, et Leo S. Price. 2014. « A 3D in Vitro Model of Differentiated HepG2 Cell Spheroids with Improved Liver-like Properties for Repeated Dose High-Throughput Toxicity Studies ». *Archives of Toxicology*, mars. https://doi.org/10.1007/s00204-014-1215-9.

Raza, Ahtasham, Helen E. Colley, Elizabeth Baggaley, Igor V. Sazanovich, Nicola H. Green, Julia A. Weinstein, Stanley W. Botchway, Sheila MacNeil, et John W. Haycock. 2017. « Oxygen Mapping of Melanoma Spheroids using Small Molecule Platinum Probe and Phosphorescence Lifetime Imaging Microscopy ». *Scientific Reports* 7 (1): 1-9. https://doi.org/10.1038/s41598-017-11153-9.

Ren, Xiang, Parham Ghassemi, Jeannine S. Strobl, et Masoud Agah. 2019. « Biophysical Phenotyping of Cells via Impedance Spectroscopy in Parallel Cyclic Deformability Channels ». *Biomicrofluidics* 13 (4): 044103. https://doi.org/10.1063/1.5099269.

Repetto, Guillermo, Ana del Peso, et Jorge L Zurita. 2008. « Neutral Red Uptake Assay for the Estimation of Cell Viability/Cytotoxicity ». *Nature Protocols* 3 (7): 1125-31. https://doi.org/10.1038/nprot.2008.75.

Risbridger, Gail P., Roxanne Toivanen, et Renea A. Taylor. 2018. « Preclinical models of prostate cancer: Patient-derived xenografts, organoids, and other explant models ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 8 (8): 1-14. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a030536.

Rizwan, Muhammad, John W. Tse, Aparna Nori, Kam W. Leong, et Evelyn K.F. Yim. 2019. « Cell–Substrate Interactions ». *Principles of Regenerative Medicine*, janvier, 437-68. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809880-6.00027-8.

Ruppen, Janine, Lourdes Cortes-Dericks, Emanuele Marconi, Golnaz Karoubi, Ralph A. Schmid, Renwang Peng, Thomas M. Marti, et Olivier T. Guenat. 2014. « A Microfluidic Platform for Chemoresistive Testing of Multicellular Pleural Cancer Spheroids ». *Lab Chip* 14 (6): 1198-1205. https://doi.org/10.1039/C3LC51093J.

Russel, Mohammad, Marios Sophocleous, Shan JiaJia, Weiping Xu, Lehui Xiao, Thomas Maskow, Mahbub Alam, et Julius Georgiou. 2018. « High-frequency, dielectric spectroscopy for the detection of electrophysiological/biophysical differences in different bacteria types and concentrations ». *Analytica Chimica Acta* 1028: 86-95. https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.04.045.

Russo, Giorgio Ivan, Nicolò Musso, Alessandra Romano, Giuseppe Caruso, Salvatore Petralia, Luca Lanzanò, Giuseppe Broggi, et Massimo Camarda. 2021. « The Role of Dielectrophoresis for Cancer Diagnosis and Prognosis ». *Cancers* 14 (1): 198. https://doi.org/10.3390/cancers14010198.

Sabounchi, Poorya, Cristian Ionescu-Zanetti, Roger Chen, Manjiree Karandikar, Jeonggi Seo, et Luke P. Lee. 2006. « Soft-State Biomicrofluidic Pulse Generator for Single Cell Analysis ». *Applied Physics Letters* 88 (18): 183901. https://doi.org/10.1063/1.2195106.

Sakamuru, Srilatha, Matias S. Attene-Ramos, et Menghang Xia. 2016. « Mitochondrial Membrane Potential Assay ». In *High-Throughput Screening Assays in Toxicology*, édité par Hao Zhu et Menghang Xia, 1473:17-22. Methods in Molecular Biology. New York, NY: Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6346-1_2.

Sakuma, Shinya, Ayaka Sato, Nobuhiko Kojima, Fumiya Tao, et Fumihito Arai. 2017. « Sensors and Actuators A : Physical Force sensor probe using quartz crystal resonator with wide measurement range for mechanical characterization of HepG2 spheroid ». *Sensors & Actuators: A. Physical* 265: 202-10. https://doi.org/10.1016/j.sna.2017.08.033.

Sanaei, Masumeh, Fraidoon Kavoosi, Abazar Roustazadeh, et Fatemeh Golestan. 2018. « Effect of Genistein in Comparison with Trichostatin A on Reactivation of DNMTs Genes in Hepatocellular Carcinoma ». *Journal of Clinical and Translational Hepatology* 6 (2): 1-6. https://doi.org/10.14218/JCTH.2018.00002.

Sanaei, Masumeh, Fraidoon Kavoosi, et Habibeh Salehi. 2017. « Genistein and Trichostatin A Induction of Estrogen Receptor Alpha Gene Expression, Apoptosis and Cell Growth Inhibition in Hepatocellular Carcinoma HepG 2 Cells ». *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 18 (12). https://doi.org/10.22034/APJCP.2017.18.12.3445.

Santini, Maria Teresa, et Gabriella Rainaldi. 1999. « Three-Dimensional Spheroid Model in Tumor Biology ». *Pathobiology* 67 (3): 148-57. https://doi.org/10.1159/000028065.

Schnichels, Sven, François Paquet-Durand, Marina Löscher, Teresa Tsai, José Hurst, Stephanie C. Joachim, et Alexa Klettner. 2021. « Retina in a dish: Cell cultures, retinal explants and animal models for common diseases of the retina ». *Progress in Retinal and Eye Research* 81 (July 2020). https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2020.100880.

Schoonen, Willem G.E.J., Jeroen A.D.M. de Roos, Walter M.A. Westerink, et Eric Débiton. 2005. « Cytotoxic Effects of 110 Reference Compounds on HepG2 Cells and for 60 Compounds on HeLa, ECC-1 and CHO Cells. » *Toxicology in Vitro* 19 (4): 491-503. https://doi.org/10.1016/j.tiv.2005.01.002.

Schwan, H. P. 1983. « Electrical properties of blood and its constitutents: Alternating current spectroscopy ». *Blut* 46 (4): 185-97. https://doi.org/10.1007/BF00320638.

Shakeri, Amid, Shadman Khan, et Tohid F. Didar. 2021. « Conventional and Emerging Strategies for the Fabrication and Functionalization of PDMS-Based Microfluidic Devices ». *Lab on a Chip* 21 (16): 3053-75. https://doi.org/10.1039/D1LC00288K.

Shao, Changmin, Junjie Chi, Hui Zhang, Qihui Fan, Yuanjin Zhao, et Fangfu Ye. 2020. « Development of Cell Spheroids by Advanced Technologies ». *Advanced Materials Technologies*, juin, 2000183. https://doi.org/10.1002/admt.202000183.

Shi, Qing-Qiang, Guo-Wei Zuo, Zi-Qiang Feng, Lv-Cui Zhao, Lian Luo, Zhi-Mei You, Dang-Yang Li, Jing Xia, Jing Li, et Di-Long Chen. 2014. « Effect of Trichostatin A on Anti HepG2 Liver Carcinoma Cells: Inhibition of HDAC Activity and Activation of Wnt/β-Catenin Signaling ». *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 15 (18): 7849-55. https://doi.org/10.7314/APJCP.2014.15.18.7849.

Shin, Sangsu, Miok Kim, Seon-Jin LEE, Kang-Seo Park, et Chang Hoon Lee. 2017. « Trichostatin A Sensitizes Hepatocellular Carcinoma Cells to Enhanced NK Cell-Mediated Killing by Regulating Immune-Related Genes ». *Cancer Genomics & Proteomics* 14 (5). https://doi.org/10.21873/cgp.20045.

Silva, Ana C., Maria J. Oliveira, Todd C. McDevitt, Mário A. Barbosa, Diana S. Nascimento, et Perpétua Pinto-do-Ó. 2019. « Comparable Decellularization of Fetal and Adult Cardiac Tissue Explants as 3D-like Platforms for In Vitro Studies ». *Journal of visualized experiments : JoVE*, nº 145: 1-8. https://doi.org/10.3791/56924.

Sirenko, Oksana, Michael K. Hancock, Jayne Hesley, Dihui Hong, Avrum Cohen, Jason Gentry, Coby B. Carlson, et David A. Mann. 2016. « Phenotypic Characterization of Toxic Compound Effects on Liver Spheroids Derived from IPSC Using Confocal Imaging and Three -Dimensional Image Analysis ». *ASSAY and Drug Development Technologies* 14 (7): 381-94. https://doi.org/10.1089/adt.2016.729.

Song, Hyun Ho Greco, Kyung Min Park, et Sharon Gerecht. 2014. « Hydrogels to model 3D in vitro microenvironment of tumor vascularization ». *Advanced Drug Delivery Reviews* 79: 19-29. https://doi.org/10.1016/j.addr.2014.06.002.

Sosa-Hernández, Juan Eduardo, Angel M. Villalba-Rodríguez, Kenya D. Romero-Castillo, Mauricio A. Aguilar-Aguila-Isaías, Isaac E. García-Reyes, Arturo Hernández-Antonio, Ishtiaq Ahmed, Ashutosh Sharma, Roberto Parra-Saldívar, et Hafiz M.N. Iqbal. 2018. « Organs-on-a-chip module: A review from the development and applications perspective ». *Micromachines* 9 (10). https://doi.org/10.3390/mi9100536.

Spencer, Daniel, Veronica Hollis, et Hywel Morgan. 2014. « Microfluidic Impedance Cytometry of Tumour Cells in Blood ». *Biomicrofluidics* 8 (6): 064124. https://doi.org/10.1063/1.4904405.

Stephan, K, P Pittet, L Renaud, P Kleimann, P Morin, N Ouaini, et R Ferrigno. 2007. « Fast Prototyping Using a Dry Film Photoresist: Microfabrication of Soft-Lithography Masters for Microfluidic Structures ». *Journal of Micromechanics and Microengineering* 17 (10): N69-74. https://doi.org/10.1088/0960-1317/17/10/N01.

Tamra, A., M.-P. Rols, D. Dubuc, et K. Grenier. 2019. « Impact of a Chemical Stimulus on Two Different Cell Lines through Microwave Dielectric Spectroscopy at the Single Cell Level ». In *2019 IEEE MTT-S International Microwave Biomedical Conference (IMBioC)*, 1-4. Nanjing, China: IEEE. https://doi.org/10.1109/IMBIOC.2019.8777745.

Tamra, Amar, Marie Deburghgraeve, David Dubuc, Marie-Pierre Rols, et Katia Grenier. 2016. « Microwave Dielectric Spectroscopy for Single Cell Irreversible Electroporation Monitoring ». In *2016 IEEE MTT-S International Microwave Symposium (IMS)*, 1-4. San Francisco, CA: IEEE. https://doi.org/10.1109/MWSYM.2016.7540429.

Tamra, Amar, David Dubuc, Marie-Pierre Rols, et Katia Grenier. s. d. « Microwave Monitoring of Single Cell Monocytes Subjected to Electroporation ». *IEEE TRANSACTIONS ON MICROWAVE THEORY AND TECHNIQUES*, 8.

Tamra, Amar, Amel Zedek, Marie-Pierre Rols, David Dubuc, et Katia Grenier. 2022. « Single cell microwave biosensor for monitoring cellular response to electrochemotherapy ». *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 1-1. https://doi.org/10.1109/TBME.2022.3170267.

Tan, Wei-Heong, et Shoji Takeuchi. 2007. « A Trap-and-Release Integrated Microfluidic System for Dynamic Microarray Applications ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104 (4): 1146-51. https://doi.org/10.1073/pnas.0606625104.

Tang, WenLai, DeZhi Tang, ZhongHua Ni, Nan Xiang, et Hong Yi. 2017. « A Portable Single-Cell Analysis System Integrating Hydrodynamic Trapping with Broadband Impedance Spectroscopy ». *Science China Technological Sciences* 60 (11): 1707-15. https://doi.org/10.1007/s11431-017-9129-7.

Tavakol, Daniel Naveed, Sharon Fleischer, et Gordana Vunjak-Novakovic. 2021. « Harnessing organs-on-a-chip to model tissue regeneration ». *Cell Stem Cell* 28 (6): 993-1015. https://doi.org/10.1016/j.stem.2021.05.008.

Teresa, Maria, et Santini Gabriella. 2008. « Three-Dimensional Spheroid Model in Tumor Biology ». *Pathobiology* 67: 148-57.

Terrell, John A., Curtis G. Jones, Giraso Keza Monia Kabandana, et Chengpeng Chen. 2020. « From cells-on-a-chip to organs-on-a-chip: Scaffolding materials for 3D cell culture in microfluidics ». *Journal of Materials Chemistry B* 8 (31): 6667-85. https://doi.org/10.1039/d0tb00718h.

Thielecke, H., J. Fleckenstein, P. Bartholomä, et C. Rübe. 2004. « Evaluation of impedance spectroscopy for the characterization of small biological samples in tissue-based test systems ». *Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology - Proceedings* 26 III: 2070-73. https://doi.org/10.1109/iembs.2004.1403608.

Thiriet, Pierre-Emmanuel, Joern Pezoldt, Gabriele Gambardella, Kevin Keim, Bart Deplancke, et Carlotta Guiducci. 2020. « Selective Retrieval of Individual Cells from Microfluidic Arrays Combining Dielectrophoretic Force and Directed Hydrodynamic Flow ». *Micromachines* 11 (3): 322. https://doi.org/10.3390/mi11030322.

Timmins, Nicholas E., et Lars K. Nielsen. 2007. « Generation of multicellular tumor spheroids by the hanging-drop method. » *Methods in molecular medicine* 140: 141-51. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-443-8_8.

Torino, Stefania, Brunella Corrado, Mario Iodice, et Giuseppe Coppola. 2018. « PDMS-Based Microfluidic Devices for Cell Culture ». *Inventions* 3 (3): 65. https://doi.org/10.3390/inventions3030065.

Tsai, Meng Tsan, Bo Huei Huang, et Kin Fong Lei. 2020. « Quantitative Monitoring of the Response of Tumor Spheroids Cultured in 3D Environment by Optical Coherence Tomography ». *IEEE Access* 8: 28360-66. https://doi.org/10.1109/ACCESS.2020.2972620.

Tsai, Sung-Lin, et Min-Haw Wang. 2016. « 24 h Observation of a Single HeLa Cell by Impedance Measurement and Numerical Modeling ». *Sensors and Actuators B: Chemical* 229 (juin): 225-31. https://doi.org/10.1016/j.snb.2016.01.107.

Tseng, Hubert, Jacob A. Gage, Tsaiwei Shen, William L. Haisler, Shane K. Neeley, Sue Shiao, Jianbo Chen, et al. 2015. « A spheroid toxicity assay using magnetic 3D bioprinting and real-time mobile device-based imaging ». *Scientific Reports* 5: 1-11. https://doi.org/10.1038/srep13987.

Tung, Yi Chung, Amy Y. Hsiao, Steven G. Allen, Yu Suke Torisawa, Mitchell Ho, et Shuichi Takayama. 2011. « High-throughput 3D spheroid culture and drug testing using a 384 hanging drop array ». *Analyst* 136 (3): 473-78. https://doi.org/10.1039/c0an00609b.

Veelken, Cornelia, Gert-Jan Bakker, David Drell, et Peter Friedl. 2017. « Single Cell-Based Automated Quantification of Therapy Responses of Invasive Cancer Spheroids in Organotypic 3D Culture ». *Methods* 128 (septembre): 139-49. https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2017.07.015.

Virtanen, Jukka, Hannu Uusitalo, Arto Palkama, et Herbert Kaufman. 1984. « THE EFFECT OF FIXATION ON CORNEAL ENDOTHELIAL CELL DIMENSIONS AND MORPHOLOGY IN SCANNING ELECTRON MICROSCOPY ». *Acta Ophthalmologica* 62 (4): 577-85. https://doi.org/10.1111/j.1755-3768.1984.tb03970.x.

Wang, Xiaolin, Shuxun Chen, Marco Kong, Zuankai Wang, Kevin D. Costa, Ronald A. Li, et Dong Sun. 2011. « Enhanced Cell Sorting and Manipulation with Combined Optical Tweezer and Microfluidic Chip Technologies ». *Lab on a Chip* 11 (21): 3656. https://doi.org/10.1039/c1lc20653b.

Ward, et King. 1997. « Mathematical modelling of avascular-tumour growth ». *Journal of Mathematics Applied in Medicine & Biology* 14: 39-69.

Wu, Liz Y., Dino Di Carlo, et Luke P. Lee. 2008. « Microfluidic self-assembly of tumor spheroids for anticancer drug discovery ». *Biomedical Microdevices* 10 (2): 197-202. https://doi.org/10.1007/s10544-007-9125-8.

Wu, Qirui, Jinfeng Liu, Xiaohong Wang, Lingyan Feng, Jinbo Wu, Xiaoli Zhu, Weijia Wen, et Xiuqing Gong. 2020. « Organ-on-a-chip: Recent breakthroughs and future prospects ». *BioMedical Engineering Online* 19 (1): 1-19. https://doi.org/10.1186/s12938-020-0752-0.

Wu, Yupan, Yukun Ren, Ye Tao, Likai Hou, et Hongyuan Jiang. 2016. « Large-Scale Single Particle and Cell Trapping Based on Rotating Electric Field Induced-Charge Electroosmosis ». *Analytical Chemistry* 88 (23): 11791-98. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b03413.

Wu, Zhuhao, Zhiyi Gong, Zheng Ao, Junhua Xu, Hongwei Cai, Maram Muhsen, Samuel Heaps, Maria Bondesson, Shishang Guo, et Feng Guo. 2020. « Rapid Microfluidic Formation of Uniform Patient-Derived Breast Tumor Spheroids ». *ACS Applied Bio Materials* 3 (9): 6273-83. https://doi.org/10.1021/acsabm.0c00768.

Xie, Shuangxi, Xiaodong Wang, Niandong Jiao, Steve Tung, et Lianqing Liu. 2017. « Programmable Micrometer-Sized Motor Array Based on Live Cells ». *Lab on a Chip* 17 (12): 2046-53. https://doi.org/10.1039/C7LC00017K.

Xu, Shihe, et Meng Bai. 2015. « Time delays in proliferation process for solid avascular tumor under the action of external inhibitors ». *International Journal of Biomathematics* 8 (2). https://doi.org/10.1142/S1793524515500187.

Xu, Shihe, Meng Bai, et Xiangqing Zhao. 2012. « Analysis of a solid avascular tumor growth model with time delays in proliferation process ». *Journal of Mathematical Analysis and Applications* 391 (1): 38-47. https://doi.org/10.1016/j.jmaa.2012.02.034.

Xu, Shihe, et Minhai Huang. 2014. « Global existence and uniqueness of solutions for a free boundary problem modeling the growth of tumors with a necrotic core and a time delay in process of proliferation ». *Mathematical Problems in Engineering* 2014 (2). https://doi.org/10.1155/2014/480147.

Yan, B. 1998. « Oscillatory flow beneath a free surface ». *Fluid Dynamics Research* 22 (1): 1-23. https://doi.org/10.1016/S0169-5983(97)00027-0.

Yang, Chengxin, et Yong J. Yuan. 2016. « Investigation on the Mechanism of Nitrogen Plasma Modified PDMS Bonding with SU-8 ». *Applied Surface Science* 364 (février): 815-21. https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2015.12.153.

Yang, Hui, Yuqiang Nie, Yuyuan Li, et Yu-Jui Yvonne Wan. 2010. « Histone Modification-Mediated CYP2E1 Gene Expression and Apoptosis of HepG2 Cells ». *Experimental Biology and Medicine* 235 (1): 32-39. https://doi.org/10.1258/ebm.2009.009252.

Yeon, Sang Eun, Da Yoon No, Sang Hoon Lee, Suk Woo Nam, Il Hoan Oh, Jaehwi Lee , et Hyo Jeong Kuh. 2013. « Application of Concave Microwells to Pancreatic Tumor Spheroids Enabling Anticancer Drug Evaluation in a Clinically Relevant Drug Resistance Model ». *PLoS ONE* 8 (9): 1-12. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073345.

Zedek, Amel. 2016. « Développement et modélisation électromagnétique de microsystèmes d'analyse cellulaire par spectroscopie diélectrique hyperfréquence jusqu'à la régionalisation de microtissus ». Université de Toulouse.

Zedek, Amel, David Dubuc, et Katia Grenier. 2017. « Microwave Permittivity Extraction of Individual Biological Cells Submitted to Different Stimuli ». In *2017 IEEE MTT-S International Microwave Symposium (IMS)*, 865-68. Honololu, HI, USA: IEEE. https://doi.org/10.1109/MWSYM.2017.8058718.

Zhang, Yi, Hongyan Liang, Huiwen Tan, Deyong Chen, Yixiang Wang, Ying Xu, Junbo Wang, et Jian Chen. 2020. « Development of Microfluidic Platform to High-Throughput Quantify Single-Cell Intrinsic Bioelectrical Markers of Tumor Cell Lines, Subtypes and Patient Tumor Cells ». *Sensors and Actuators B: Chemical* 317 (août): 128231. https://doi.org/10.1016/j.snb.2020.128231.

Zhang, Zhao, Xiaowen Huang, Ke Liu, Tiancong Lan, Zixin Wang, et Zhen Zhu. 2021. « Recent Advances in Electrical Impedance Sensing Technology for Single-Cell Analysis ». *Biosensors* 11 (11): 470. https://doi.org/10.3390/bios11110470.

Zhang, Zhizhong, Tianyang Zheng, et Rong Zhu. 2020. « Single-Cell Individualized Electroporation with Real-Time Impedance Monitoring Using a Microelectrode Array Chip ». *Microsystems & Nanoengineering* 6 (1): 81. https://doi.org/10.1038/s41378-020-00196-0.

Zhao, Yang, Mei Jiang, Deyong Chen, Xiaoting Zhao, Chengcheng Xue, Rui Hao, Wentao Yue, Junbo Wang, et Jian Chen. 2016. « Single-Cell Electrical Phenotyping Enabling the Classification of Mouse Tumor Samples ». *Scientific Reports* 6 (1): 19487. https://doi.org/10.1038/srep19487.

Zhu, Pingan, et Liqiu Wang. 2017. « Passive and Active Droplet Generation with Microfluidics: A Review ». *Lab on a Chip* 17 (1): 34-75. https://doi.org/10.1039/C6LC01018K.

Zitzmann, Franziska D., Sabine Schmidt, Max Naumann, Detlev Belder, Heinz Georg Jahnke, et Andrea A. Robitzki. 2022. « Multielectrode biosensor chip for spatial resolution screening of 3D cell models based on microcavity arrays ». *Biosensors and Bioelectronics* 202 (January): 114010. https://doi.org/10.1016/j.bios.2022.114010.

Zou, Y., et Z. Guo. 2003. « A review of electrical impedance techniques for breast cancer detection ». *Medical Engineering and Physics* 25 (2): 79-90. https://doi.org/10.1016/S1350-4533(02)00194-7.

Annexes

Productions scientifiques

Revues internationales

- Athira, D. Donrdorp, J. Rudolf, **O. Peytral-Rieu**, M. Chatzigeorgiou, "Comprehensive analysis of locomotion dynamics in Ciona intestinalis reveals how neuromodulators flexibly shape the behavioral repertoire of a protochordate", Plos Biology, 2022, DOI : 10.1371/journal.pbio.3001744

- J. Muñoz-Enano, **O. Peytral-Rieu**, P. Vélez, D. Dubuc, K. Grenier, F. Martín, "Characterization of the Denaturation of Bovine Serum Albumin (BSA) Protein by Means of a Differential-Mode Microwave Microfluidic Sensor Based on Slot Resonators", IEEE Sensors, 2022, DOI : 10.1109/JSEN.2022.3181542

- M. Mertens, M. Chavoshi, **O. Peytral-Rieu**, K. Grenier, D. Schreurs, "Dielectric Spectroscopy", Microwave Magazine, 2023.

Revues internationales soumises

- **O. Peytral-Rieu**, C. Gironde, C. Furger, D. Dubuc, K. Grenier, "Microwave biosensor for the non-invasive and label-free dielectric characterization of cytotoxicity in single HepG2 spheroids", Lab on Chip.

- **O. Peytral-Rieu,** D. Dubuc, K. Grenier, "Microwave-based sensor for the non-invasive and real-time analysis of 3D biological microtissues: microfluidic improvement and sensitivity study, Transactions on Microwave Theory and Techniques.

- **O. Peytral-Rieu,** D. Dubuc, K. Grenier, "RF sensor dedicated to the dielectric characterization of spheroids between 500MHz and 20GHz", International Journal of Microwave and Wireless Technologies.

Congrès Internationaux

- **O. Peytral-Rieu**, K. Grenier, and D. Dubuc, "Microwave Sensor Dedicated to the Determination of the Dielectric Properties of 3D Biological Models from 500MHz to 20GHz," in 2021 IEEE MTT-S International Microwave Symposium (IMS), Jun. 2021, Atlanta (USA), pp. 222–225, doi: 10.1109/IMS19712.2021.9574794

- **O. Peytral-Rieu**, D. Dubuc, and K. Grenier, "Microwave Microfabricated Sensor Dedicated to the Dielectric Characterization of Biological Microtissues," in 2022 URSI AT-AP-RASC, Atlantic Radio Science Meeting, June 2022, Gran Canaria (Spain), pp. 3–6.

- K.Grenier, **O. Peytral-Rieu**, D. Dubuc, « Extension of Possibilities for Non-Invasive Analysis by Microwave Spectroscopy of 3D Biological Models", in 2022 IEEE MTT-S International Microwave Biomedical Conference (IMBioC), May 2022, Suzhou (China).

Congrès National et Régional

- **O. Peytral-Rieu,** D. Dubuc, K. Grenier, « Optimisation et évaluation de la stabilité d'un biocapteur HyperFréquence dédié à la caractérisation diélectrique de sphéroïdes de 500MHz à 20GHz », Journées de Caractérisation Microonde et Matériaux, Tours (France), Avril 2023.

- **O. Peytral-Rieu**, D. Dubuc, K. Grenier, « Dispositif RF dédié à la détermination des propriétés diélectriques de sphéroïdes entre 500MHz et 20GHz », dans XXIIème journées Nationales Microondes (JNM), Juin 2022.
→ Prix du meilleur papier 2022 aux JNM

- **O. Peytral-Rieu**, « Dispositif RF dédié à la détermination des propriétés diélectriques de sphéroïdes entre 500MHz et 20GHz », présentés au Congrès de l'école doctorale Génie Electrique, Electronique, Télécommunications et Santé en avril 2022 à Toulouse.
→ Prix de la meilleure présentation orale

ARXIV

- James C. Hwang, **Olivia Peytral-Rieu**, Maurice Philippson. A translation of Maurice Philippson's "Principles of the Electrical Resistance of Living Tissue". 2019, 5 p., DOI : 10.48550/arXiv.2105.06428, id HAL : hal-03951612

Distinctions

- ➔ Prix du meilleur papier présenté aux JNM 2022
- ➔ Prix de la meilleure présentation orale au congrès de l'école doctorale GEETS (2022)