École Doctorale Sciences Pour l'Ingénieur – 072

Thèse pour l'obtention du grade

Docteur de L'Université De Lille – Sciences et Technologies

Spécialité "Micro-nanosystèmes et Capteurs"

Intitulée

Développement d'un dispositif microfluidique pour la photoporation de cellules biologiques à hauts débits

Préparée et Soutenue par

Majid Layachi

Le 27 janvier 2021 devant :

Mme. Chantal Pichon	Professeure	CBM	Université d'Orléans	Rapporteure
Mme. Marie-Pierre Rols	DR	IPBS	Université de Toulouse 3	Rapporteure
M. Kevin Braeckmans	Professeur	BIG	Ghent University	Examinateur
M. Fabrizio Cleri	Professeur	IEMN	Université de Lille	Président
M. Cyril Lafon	DR	LabTAU	Université de Lyon 1	Examinateur
M. Guillaume Lajoinie	Prof. Assistant	POF	University Of Twente	Examinateur
M. Anthony Treizebré	MCF	IEMN	Université de Lille	Invité
M. Vincent Thomy	MCF (HDR)	IEMN	Université de Lille	Directeur
M. Emmanuel Courtade	MCF (HDR)	PhLAM	Université de Lille	Co-Directeur

iemn Institut d'Electronique, de Microélectronique et de Nanotechnologie UMR CNRS 8520

PhLAM Physique des Lasers Atomes et Molécules

erc European Research Council Established by the European Commission

Development of a Microfluidic Device for High Throughput Photoporation

Cell transfection aims at introducing foreign material inside a biological living cell. This intracellular drug transport process is at the heart of many diagnosis procedures and a key step in gene therapy. In view of these stakes, high performances are of importance, namely the success rate (positive and viable cells), the quality (uptake) and the throughput (treatment rate). Research has been conducted to understand how the spontaneous uptake of macromolecules (endocytosis) is limited while workarounds to bypass cell barriers for controlled intracellular drug release has received consistent payoff. However, up-to-date techniques mimicking bio-elements or introducing physical means suffer several drawbacks. Nevertheless, Gold nanoparticle (AuNP) mediated photoporation has stood out as a promising tool to permeabilize cell membranes through laser induced Vapour NanoBubble (VNB) generation. Based on these VNBs, a novel microfluidic approach is presented in this work, offering high throughput prospects with no contact with AuNPs to retrieve AuNP-free treated viable cells.

We set up a new optofluidic experiment, integrating the use of advected AuNPs to achieve VNB generation near suspended cells. This method allows high throughput, high efficiency and low cytotoxicity drug delivery. Based on hydrodynamic focusing, the approach allows the control and tuning of the cell-to-AuNP distance. With the optical setup used, throughput ranging from 10^3 to 10^4 cells/min can be achieved. Interestingly, it yields a better viability than the mixed AuNP-cell approach ($\sim 80\%$ *vs.* $\sim 40\%$). As a matter of fact, viability increases with distance whereas the positive fraction decreases ($\sim 30\%$ *vs.* $\sim 50\%$). Both a transfection and a rheological tool, our optofluidic device is a bridge toward triggered single cell transfection, circumventing barriers to the clinical deployment of emerging cellular therapies.

Keywords : Photoporation, plasmonic nanobubbles, microfluidics, high-throughput intracellular delivery, nanoparticule micro-positioning

Développement d'un dispositif microfluidique pour la photoporation de cellules biologiques à hauts débits

La transfection de cellules vise à injecter du matériel génétique dans des cellules biologiques vivantes. L'incorporation intracellulaire de molécules exogènes est un processus nécessaire en diagnostique et une étape clef dans la thérapie génique. Ces enjeux nécessitent des performances en terme d'efficacité (cellules viables positives), de qualité (incorporation) et de rendement (cadence de traitement). Des recherches sur les mécanismes limitant l'incorporation naturelle de macromolécules (endocytose) sont menées et des techniques sont développées pour surmonter les barrières cellulaires et réaliser le transfert intracellulaire de manière contrôlée. Cependant, ces systèmes biologiques, chimiques ou physiques présentent certains inconvénients. La photoporation par intermédiaire de nanoparticules d'or (AuNP) réalise néanmoins des performances intéressantes en perméabilisant les membranes cellulaires, grâce à des nano-bulles de vapeur (VNB) générées par laser. Une nouvelle approche est présentée ici de photoporation en environnement microfluidique, dans le but d'améliorer le rendement et de garantir la séparation entre les cellules et les AuNP afin d'obtenir un échantillon sans éléments cytotoxiques.

Nous avons développé un nouveau système opto-fluidique intégrant des AuNP en suspension pour générer des VNB au voisinage des cellules. Cette méthode permet un rendement et un taux de transfection élevés et réduit la cytotoxicité de la transfection. L'approche permet le contrôle de la distance entre cellules et AuNP. En l'état, le rendement du dispositif peut atteindre 10^3 à 10^4 cell./min. Surtout, la séparation réalise une meilleure viabilité des cellules photoporées en comparaison avec la méthode sans séparation ($\sim 80\%$ contre $\sim 40\%$) : l'augmentation de la distance améliore la viabilité mais réduit la fraction positive ($\sim 30\%$ contre $\sim 50\%$). Outil rhéologique ou de transfection, ce dispositif est une étape supplémentaire vers la transfection efficace et bio-compatible de cellule unique, un atout majeur pour le développement clinique des nouvelles thérapies cellulaires.

Mots-clés : Photoporation, nano-bulle plasmonique, microfluidique, transfection cellulaire haut-débit, micro-contrôle de nanoparticule

AVANT-PROPOS

La transfection rassemble les techniques visant à injecter du matériel génétique dans des cellules biologiques vivantes. L'incorporation intracellulaire, de médicaments ou d'ADN par exemple, est un processus nécessaire dans les domaines diagnostique et thérapeutique. Il s'agit d'une étape clef dans la thérapie génique et ses applications en immunothérapie. Ces enjeux nécessitent des performances accrues en terme d'efficacité (cellules viables ayant répondu positivement), de qualité (efficacité d'incorporation) et de rendement (cadence de traitement). Le contrôle et la précision du transfert intracellulaire d'agents exogènes sont alors primordiaux pour ces constructions cellulaires. Des recherches sur les mécanismes limitant l'incorporation naturelle de macromolécules (endocytose) sont menées depuis quelques décennies. Parallèlement, des techniques sont développées pour surmonter les barrières cellulaires d'incorporation et pour réaliser l'introduction de molécules exogènes avec de bonnes performances sans dégradation ni risque.

Plusieurs systèmes ont été conçus sur la base de comportements biologiques, chimiques ou physiques. Les approches les plus répandues sont essentiellement basées sur l'utilisation de vecteurs. Virale ou chimique, la stratégie vise à induire l'endocytose de vecteurs porteurs des macromolécules d'intérêt. D'autres approches consistent à créer des pores membranaires pour permettre la diffusion de l'agent exogène à l'intérieur de la membrane en contournant les voies d'endocytose. L'électroporation ou la sonoporation par exemple utilisent des champs électrique ou acoustique pour réaliser cette perméabilisation. Ces techniques présentent cependant certaines inconvénients. L'utilisation de vecteurs peut être source de cytotoxicité et/ou mettre en danger la santé du patient lors d'une thérapie. Par ailleurs, l'efficacité et la viabilité peuvent être fortement réduites selon la taille de la molécule ou les types cellulaires. Parmi la catégorie de techniques physiques, l'utilisation des lasers avec des intermédiaires réalise néanmoins des performances intéressantes.

La photoporation par intermédiaire de nanoparticules d'or (AuNP) est basée sur la résonance de plasmons de surface. Une excitation optique (impulsion laser) est convertie par les AuNPs en énergie thermique ou en source acoustique sous forme de nano-bulles de vapeur (VNB). Ces dernières génèrent des contraintes mécaniques qui créent des pores temporaires dans la membrane cellulaire à proximité. La photoporation séduit par son taux de transfection, sa viabilité et son efficacité d'incorporation élevés et ce pour différentes lignées cellulaires. Cependant, différents aspects de cette approche peuvent être optimisés. D'une part, le rendement de traitement doit être amélioré pour remplir les critères de thérapie ($\sim 10^6 - 10^9$ cell./min). D'autre part, le contact prolongé entre cellules et nanoparticules induit une nanotoxicité et limite les applications *in vivo*.

Sur la base de ce phénomène photo-acoustique très efficace, une nouvelle approche est présentée dans ce travail en environnement microfluidique dans le but d'améliorer le rendement mais surtout d'introduire la séparation physique entre cellules et AuNP pendant la photoporation limitant sa nanotoxicité. Ce projet opto-fluidique innovant, dédié à l'administration cellulaire de médicament, s'inscrit dans le cadre du projet ERC "Nanobubble" porté par Pr. Kevin Braeckmans de l'Université de Gand. Il a fait appel à de nouvelles expertises et approches expérimentales. Nous avons mis au point une méthode de photoporation en flux utilisant des AuNPs en suspension sans contraintes de type cellules ou de nanoparticules. Elle permet d'améliorer le rendement, l'efficacité de transfection et de réduire la cytotoxicité du traitement de cellules adhérentes ou en suspension. Pour que la séparation entre cellules et AuNPs ne se fasse pas au détriment des performances de transfection, il est nécessaire de générer des VNBs autour d'AuNP contrôlées spatialement.

Dans un premier temps, l'effet des paramètres clefs comme la fluence et la concentration de AuNPs sur les performances a été étudié en photoporant des cellules adhérentes en cultures. Les valeurs de fraction positive et de viabilité ont été comparées à la littérature et sont compatibles avec la perméabilisation par génération de VNB. Le seuil de cette dernière a ensuite été caractérisé en mesurant l'efficacité d'incorporation avec une sonde moléculaire de 10 kDa (fluorescence intracellulaire des cellules photoporées).

Le montage optique a ensuite été complété par une puce microfluidique pour réaliser une première approche de photoporation en flux. La première étape a consisté à irradier une suspension de cellules et de AuNPs sans pré-incubation. Grâce à ce protocole de calibration, des cellules remises en suspension sans AuNP adsorbées (contrairement à la photoporation de cellules adhérentes) ont été photoporées à haut débit. En outre, la génération de VNBs a été caractérisée par la fraction positive et l'efficacité d'incorporation. Une étude de la concentration de AuNPs a montré une viabilité et une fraction positive améliorés pour des valeurs plus faibles de concentration (respectivement de ~ 40 à $\sim 80\%$ et ~ 50 de $\sim 75\%$ respectivement).

La deuxième étape a débutée par des simulations numériques afin de déterminer la meilleure géométrie et le paramètre le plus pertinent pour contrôler la distance entre les cellules et les AuNPs en écoulements séparés dans un canal microfluidique. Avec la focalisation hydrodynamique, des puces microfluidiques ont été conçues en considérant les contraintes expérimentales tout en contrôlant directement,*via* les débits, l'organisation de l'écoulement – notamment pour le positionnement des cellules par rapport aux AuNP. L'introduction de la séparation entre les cellules et les sites de génération de VNB permets d'améliorer la viabilité par rapport à la première approche sans séparation ($\sim 80\%$ contre $\sim 40\%$) : l'augmentation de la distance améliore la viabilité mais réduit la fraction positive. Cette dernière atteint un optimum de $25 - 30\%$ alors que l'approche en suspension réalise $\sim 50\%$ de cellules positives. Par ailleurs, ce dispositif opto-fluidique permet une cadence de 10^3 à 10^4 cell./min.

La caractéristique principale de cette approche reste la perméabilisation à distance des cellules grâce à la "propagation" des contraintes. Les cellules sont alors séparées d'éléments cytotoxiques tout au long du protocole. Par ailleurs, cette distance est un paramètre supplémentaire permettant de contrôler les contraintes mécaniques appliquer et par conséquent d'adapter la photoporation en flux à différentes lignées cellulaires selon leurs sensibilités et leurs propriétés mécaniques. Le rendement reste inférieur aux standards requis mais il peut être amélioré en augmentant le taux de répétition du laser impulsionnel. Le dispositif actuel peut également être utilisé dans des protocoles de cellules uniques. Outil rhéologique ou de transfection, ce dispositif est une étape supplémentaire vers la transfection de cellule unique de façon efficace et bio-compatible, un atout majeur pour le développement clinique des nouvelles thérapies cellulaires.

FOREWORD

Cell transfection is a method for introducing foreign material inside a biological living cell. This intracellular delivery process – of drugs or DNA for example – is at the heart of many therapy and diagnosis procedures. More importantly, it is the first and key step in gene therapy and its application in disease treatments (cancer immuno-therapy). In view of these stakes, high performances are of importance, namely the success rate (positive and viable cells), the quality (uptake efficiency) and the throughput (treatment rate). The improvement of cell manipulations thus requires a controlled and efficient release of large molecular agents through the cell membrane. For several decades, research has been conducted to understand the mechanisms limiting the spontaneous uptake of foreign macro-molecules (endocytosis). Meanwhile, workarounds to bypass the sophisticated barriers developed by cells have attracted quite some attention. Developing means of successful intracellular transport received consistent payoff.

Many techniques were developed exploiting virus behaviour, mimicking bio-elements with chemistry or introducing physical means into play. One of the most spread approaches is vector based transfection. It consists of introducing foreign vectors such as viruses or chemically engineered particles to induce endocytosis. Other approaches aim at creating pores in the membrane so that exogenous molecules diffuse inside the cell independently from its dedicated pathways. Electroporation and sonoporation, for instance, were designed based on field-induced (electric or acoustic) permeabilization. However, these cell delivery systems suffer several drawbacks. The presence of vectors can induce cytotoxicity or endanger the patient's health. Moreover, efficiency and viability can be dramatically decreased depending on the drug size or cell type. Nevertheless, in this physical approach for transfection, light with the help of intermediaries has shown to be a promising tool.

Gold nanoparticle (AuNP) mediated photoporation takes advantage of surface plasmon resonance and its feature of converting an optical excitation (laser pulse) into a thermal source or more interestingly into a mechano-acoustical source named Vapour NanoBubbles (VNBs). These cavities emit mechanical stress that creates transient nanopores in surrounding cell membranes. Photoporation has gathered much interest thanks to its high transfection rate, viability and uptake efficiency on multiple cell lines.

Yet, several aspects require further optimizations. On one hand, an increased throughput is needed to meet diagnosis requirement ($\sim 10^6 - 10^9$ cells/min). On the other hand, the extended contact of cells with AuNPs is a severe limitation due to nano-toxicity and poor *in vivo* compatibility.

A novel approach using photoporation with VNB generation in a microfluidic chip is presented in this work, part of the ERC grant "Nanobubble" with P.I. K. Braeckmans from Ghent University, Belgium. This approach offers high throughput prospects with no direct contact with AuNPs, where the spatial organization of both cells and AuNPs becomes a key point to retrieve AuNP-free treated viable cells. To achieve this objective, we set up a new optofluidic experiment integrating the use of advected non specific AuNPs to achieve VNB generation around adherent or circulating cells. The proposed method allows high throughput, high efficiency and low cytotoxicity drug delivery.

Firstly, the effect of key parameters (laser intensity and AuNP concentration) on the outputs are studied through photoporating adherent cultured cells. Values of positive fraction, uptake efficiency and viability are then compared to literature. The VNB generation threshold identification is then carried out by measuring the molecular probe uptake (amount of 10 kDa size fluorescent molecules inside irradiated cells) thus determining the VNB generation during the AuNPs laser-irradiation.

This versatile optical setup is then completed by integrating a microfluidic device. First, a protocol without pre-incubation of cells with AuNPs is developed to achieve flow photoporation of a cell-AuNP suspension. This calibration step aims at photoporating cells with high throughput but without any AuNP attached to the cell membrane. More importantly, It aims at determining the VNB generation in a confined environment that is the microfluidic channel. Uptake efficiency and positive fraction confirm that VNBs are able to permeabilize the cells' membranes. Study of AuNP concentration shows optimised viability (~ 40 to $\sim 80\%$) and positive fraction (~ 50 to $\sim 75\%$) for lower values of concentration.

Additionally, numerical simulations has been studied to determine the best geometry and mean to control the distance between cells and AuNPs when they flow separately while using passive microfluidics techniques. Based on hydrodynamic focusing, chips are designed accordingly to the protocol constrains to allow the direct control *via* flow rates of the flow organization, particularly the fine-tuning of the distance between the cell and AuNP flows. Interestingly the separation yields a better viability than that obtained with the first approach (without separation) reaching control values ($\sim 80\%$ *vs.* $\sim 40\%$). As a matter of fact, increasing the distance between cells and AuNPs increases viability but decreases the positive fraction. The later reaches $25-30\%$ whereas the first approach achieves a $\sim 50\%$ positive fraction. Moreover, with the optical setup used, throughput ranging from 10^3 to 10^4 cells/min can be achieved.

Most importantly, the main feature of this protocol remains the harvest of acoustical energy within a distance of potentially cytotoxic material. Additionally to this improvement, tuning the AuNP-to-cells distance controls the mechanical stress caused by the VNB collapse which helps to optimize the optofluidic device for stress-sensitive cells. Even though the throughput is lower than the afore mentioned requirements, it can be improved with a higher repetition rate laser or used in single cell protocols with appropriate triggering. Both a transfection and a rheological tool, our optofluidic device is a bridge toward triggered labelled single cell transfection, circumventing thus barriers to the translation and clinical deployment of emerging cellular therapies.

REMERCIEMENTS

"Le Lillois est volontaire."
Poète contemporain.

Ben té... À l'issue de ces trois années, l'heure est à la rétrospective. Et à l'instar, des débuts des différents chapitres ci-après, la rédaction débute par cette interrogation, Ô combien fourbe : comment vais-je commencer. Pourquoi pas chronologiquement ?

Habituellement le matin, à mon arrivée au PhLAM, je croise Michel, Philippe et Stéphane (ils garderont l'anonymat). Isabelle arrive à ce moment là. Dans les couloirs, on peut croiser Murielle, Bénédicte et Mickaël. Sylvie et Isabelle sont également déjà là. Pas longtemps après, voilà Thierry, Nathalie, Sandrine, Hervé, Walter, Stéphanie et Marie-T. Il doit être aux environs de huit heures. Tout le monde est là pour faire tourner la boutique. Je tiens aujourd'hui à vous remercier, à ma petite échelle, non seulement pour les différents coup de mains que vous m'avez filé mais surtout pour le travail énorme que vous fournissez pour faire en sorte que tout se déroule au mieux. Cela est peut être dit maladroitement mais très sincèrement. Je n'oublie surtout pas les collègues de l'autre côté du campus, à l'IEMN, que j'ai moins côtoyés par la force de choses mais pour qui ma gratitude est tout autant vivace. Un grand merci à Nora, Andy et les collègues de la centrale de microfabrication.

Cette multitude de concours actifs tout autour de moi m'ont permis d'aboutir au travail présenté ici. Ce dernier tient en partie à l'implication de mes deux directeurs de thèses. Je remercie Emmanuel et Vincent pour l'expérience qu'ils m'ont permis de vivre, leur présence et écoute et parfois leur patience. Toujours pour l'encadrement (et la patience), je remercie également Quentin, Anthony, Jean et François pour leurs investissements, leurs temps et leurs conseils. Vient alors les membres de l'équipe, entre Alex, Marie, Laurent qui nous a rejoint avec David et Quentin, Raoul et bien d'autres encore là ou partis vers d'autres horizons. Ce sont les échanges avec eux, les discussions et les assistances expérimentales qui ont permis, à bien des moments, de débloquer certaines situations et de ne pas perdre pied tout au long de ce projet.

Aussi, voudrai-je remercier les membres du jury pour avoir accepté d'examiner ce travail et de participer à la soutenance et pour les discussions enrichissantes et constructives lors de la soutenances. Je remercie Mesdames C. Pichon et M.-P. Rols pour avoir accepté d'être les rapporteures de ce mémoire. Je remercie Messieurs Cyril Lafon et Guillaume Lajoinie d'avoir examiner ces travaux de thèse. Je remercie F. Cléri, Président du jury, d'avoir accepté de juger ce travail. Je remercie enfin Monsieur K. Braeckmans en tant que membre du jury,

mais aussi en tant que porteur du projet. Autant scientifiquement que socialement, nos discussions et échanges ont donné une saveur à cette collaboration.

Je change désormais de sphère – même si un recouvrement existe et que bien des noms cités ci-dessus pourraient facilement trouver leur place ci-après – pour remercier toutes ces personnes m'ayant entouré pendant tout ou partie de ces trois ans et demi de doctorat. Plus de trois ans est une durée longue. Léa, Peter, Anastasie, Alexis, Gaëlle, Noelig, Ludivine, les copains d'Hellemmes et Lezennes, les perruches de 2XL. Il y eut des départs et des arrivées. Les premiers sont regrettés, les seconds bénis. Mais ma gratitude est et reste sincère. Encore merci pour tous ces moments : réunions "pédago", pause clope, pause café radis, pause folklore ou encore "LA despé". Merci pour la joie, la georgette, le panache et j'en passe.

Je ne fais qu'érafler la surface de cette liste de remerciement. Mais je la clôturerai par les procréateurs et celui qui en a aussi profité. À ma famille, merci d'être ma mère, mon père et mon frère. Il est certaines choses évidentes qu'il est inutile de citer mais sobrement : "lekhbar f rassekoum".

TABLE DES MATIÈRES

Avant-Propos iii

Foreword v

Remerciements viii

1 Introduction : Transfection cellulaire par photogénération de nanobulles de vapeur 2

1 Transfection de cellules vivantes . . . 3

1.1 Enjeux et problématiques du transfert intracellulaire . . . 3

1.2 La transfection par vecteur . . . 3

2 Transfection par perméabilisation physique . . . 4

2.1 Magnétofection et transfert intracellulaire d'ADN . . . 5

2.2 L'électroporation : la méthode "impulsionnelle" . . . 5

2.3 Approche rhéologique de l'hydroporation . . . 6

2.4 Sonoporation pour la perméabilisation . . . 6

3 Transfection par interaction lumière-matière . . . 6

3.1 Perméabilisation par photoporation directe . . . 7

3.2 Photoporation avec intermédiaires plasmoniques . . . 8

3.2.1 Excitation optique des nanoparticules d'or par résonance de plasmons de surface 8

3.2.2 Génération de nano-bulles de vapeur (VNB) pour la perméabilisation membranaire 9

4 Efficacité et viabilité de la photoporation . . . 10

4.1 Cytotoxicité des nanoparticules d'or . . . 11

4.2 Transfection de lignées cellulaires par nano-bulles de vapeur . . . 11

4.3 Génération de nano-bulles de vapeur à distance . . . 12

4.4 Intérêt de la microfluidique pour le traitement de cellules biologiques . . . 13

5 La photoporation par nano-bulles en flux . . . 14

2 Photoporation de cellules adhérentes 16

1 Mécanismes de photoporation avec intermédiaires plasmoniques . . . 17

2 Matériels et Méthodes : dispositif et protocole de photoporation . . . 21

2.1 Préparation de l'échantillon biologique . . . 21

2.2 Excitation optique des nanoparticules d'or par résonance de plasmons de surface . . . 22

2.2.1 Contraintes de fluence pour le laser de photoporation . . . 23
2.2.2 Mise en forme du faisceau optique pour la photoporation . . . 25
2.3 Photoporation de cellules adhérentes et acquisition des résultats . . . 26
2.3.1 Photoporation d'un échantillon et automatisation de l'irradiation par laser . . . 26
2.3.2 Imagerie en fluorescence post-photoporation . . . 27
2.3.3 Détection d'objet par segmentation d'image . . . 28
2.3.4 Mesure de la fluorescence et de la viabilité lors de la photoporation . . . 28
3 Résultats et Discussion : photoporation et variabilité . . . 31
3.1 Perméabilisation et incorporation de macromolécules par photoporation . . . 31
3.1.1 Viabilité des cellules après photoporation directe et par nanoparticules . . . 31
3.1.2 Fraction positive globale avec des nanoparticules . . . 33
3.1.3 Photoporation à l'échelle de la cellule unique . . . 35
3.1.4 Quantification du seuil de photoporation par nano-bulles de vapeur : méthode . 37
3.2 Effet de la concentration de nanoparticules sur la perméabilisation . . . 39
3.2.1 Fraction positive globale et viabilité de la photoporation . . . 39
3.2.2 Marquage à l'échelle de la cellule unique (FITC-Hoechst) . . . 40
3.2.3 Variabilité de la fluence laser . . . 44
3.3 Variabilités dans le processus de photoporation . . . 46
3.3.1 Seuil de photoporation par nano-bulles de vapeur . . . 46
3.3.2 Variabilité de la concentration ambiante et du signal émis . . . 49
4 Conclusions : Photoporation par nano-bulles de vapeur . . . 50

3 Photoporation en flux : suspension de cellules avec nanoparticules 52
1 Photoporation en flux de suspension cellules-nanoparticules . . . 53
2 Matériels et Méthodes : Approche opto-fluidique pour la photoporation en flux . . . 57
2.1 Préparation de l'échantillon biologique . . . 57
2.2 Dispositif opto-fluidique pour la photoporation en flux . . . 57
2.2.1 Focalisation hydrodynamique en puce microfluidique . . . 58
2.2.2 Contrôle des débits d'écoulement . . . 60
2.2.3 Adaptation du banc optique à l'écoulement cellulaire . . . 60
2.3 Photoporation en flux avec nanoparticules au voisinage des cellules . . . 62
2.4 Analyse de l'efficacité et de la viabilité de photoporation . . . 63
3 Résultats et Discussion : Photoporation en flux avec nanoparticules dissociées . . . 65
3.1 Photoporation en flux sans pré-incubation de nanoparticules . . . 65
3.1.1 Viabilité de la photoporation en flux . . . 65
3.1.2 Génération de nano-bulles pour la photoporation en flux . . . 67
3.2 Influence du cisaillement sur la fraction positive . . . 70
3.2.1 Effet du cisaillement sur la viabilité des cellules en écoulement . . . 70
3.2.2 Fractions positives entre $J0$ et $J+1$ . . . 71
3.2.3 Perméabilisation "passive" en flux (sans irradiation) . . . 72
3.3 Réduction de la concentration d'AuNP pour la photoporation en flux . . . 75
3.3.1 Diminution de la concentration de nanoparticules . . . 75
3.3.2 Évolution de la fluorescence intracellulaire entre $J0$ et $J+1$ . . . 77
3.4 Irradiation à 1, 2 ou 3 impulsions laser pour la photoporation en flux . . . 81
3.4.1 Augmentation du nombre d'impulsions de photoporation . . . 81

3.4.2 Fluorescence intracellulaire entre $J0$ et $J+1$ 82
4 Conclusions sur la photoporation en flux 86

4 Organisation spatiale de nanoparticules en microfluidique pour la photoporation 88
1 Organisation de particules en écoulement microfluidique 89
2 Matériels et Méthodes : Focalisation cellules-nanoparticules en écoulement microfluidique 94
2.1 Géométrie de focalisation et écoulement de particules 94
2.2 Modélisation de l'écoulement en canal microfluidique 95
2.3 Écoulement multiphasique en régime stationnaire ou dynamique 96
2.3.1 Calcul de phases avec suivi d'écoulement en 2D 96
2.3.2 Calcul pas à pas de la trajectoire pour une suspension de particules 97
2.4 Mesure et analyse : suivi des écoulements microfluidiques 100
3 Résultats et Discussion : organisation spatiale des écoulements 102
3.1 Contrôle avec un niveau de focalisation hydrodynamique 102
3.1.1 Influence du débit sur la focalisation dans le plan horizontal 102
3.1.2 Déplacement du front de nanoparticules avec le rapport des débits latéraux . . . 103
3.1.3 Description analytique de la focalisation 104
3.1.4 Organisation spatiale du flux de nanoparticules 108
3.2 Contrôle avec deux plans de focalisation hydrodynamique 110
3.2.1 Focalisation 3D et concentration des nanoparticules 111
3.2.2 Modulation de la concentration de nanoparticules par unité de volume 112
3.3 Contrôle de la distance cellules-nanoparticules avec un flux séparateur 114
3.3.1 Géométrie à plan de focalisation unique 114
3.3.2 Taux de cisaillement pour les cellules 114
4 Conclusions et Ouverture 118

5 Photoporation en flux : séparation des cellules et des nanoparticules en microfluidique 120
1 Photoporation en flux à distance 121
2 Matériels et Méthodes : Photoporation en flux avec séparation 125
2.1 Dispositif opto-fluidique pour la photoporation en flux à distance 125
2.2 Photoporation de cellules à distance : les différentes approches 127
2.3 Protocole post-photoporation : préparation d'échantillon et analyse des données 130
3 Résultats et Discussion : Photoporation à distance 131
3.1 Contrôle de la distance cellule-nanoparticules pendant la photoporation avec séparation . 131
3.1.1 Approche avec gaine de nanoparticules et fluence 131
3.1.2 Approche avec gaine de cellules et irradiation 133
3.2 Tampon séparateur pour contrôler la distance cellules-nanoparticules 134
3.2.1 Optimum de distance entre viabilité et perméabilisation 135
3.2.2 Efficacité d'incorporation et fluorescence intracellulaire 139
3.3 Taux de perméabilisation : gaine de nanoparticules et liquide séparateur 146
3.3.1 Photoporation avec séparateur et fluorescence intracellulaire 146
3.3.2 Photoporation avec séparateur et efficacité d'incorporation 147
4 Conclusions et perspectives : séparation des phases et modulation des contraintes 151

6 Conclusion : Photoporation en flux avec séparateur, viable et verstatile 155
1 Photoporation de cellules par nano-bulles de vapeur . . . 156
2 Perméabilisation par photoporation avec VNB . . . 156
3 Viabilité de la photoporation avec VNB . . . 158
4 Photoporation en flux avec séparateur . . . 159
5 Réponse cellulaire et améliorations . . . 160
5.1 Propriétés mécaniques des cellules et efficacité de perméabilisation . . . 160
5.2 Mécanisme de perméabilisation et réparation de la membrane cellulaire . . . 160
5.3 Seuil d'endommagement laser . . . 161
5.4 Adaptation d'impédance et onde de choc . . . 162
6 Applications en biologie et en médecine . . . 164

Annexes 166

A Caractérisation et conception du montage optique 167
1 Oscillateur Paramétrique Optique . . . 167
2 Faisceau Gaussien . . . 168
3 Calcul de la propagation du laser dans le montage optique . . . 169
4 Mesure par la méthode de la lame . . . 176

B Système d'imagerie 179
1 Microscopie en fluorescence . . . 179
2 Système de mise au point . . . 179

C Exploitation des images de microscopie 184
1 Post-traitement de l'échantillon en vue de l'imagerie . . . 184
2 Reconstruction des échantillons de photoporation pour les mesures locales . . . 186
3 Segmentation d'images issues de la microscopie avec l'objectif 20x . . . 189
4 Initialisation du nombre de cellules pour le suivi de croissance . . . 197

D Puce Microfluidique et microfabrication 199
1 Protocoles de microfabrication . . . 199
2 Le collage anodique . . . 201

E Contrôle et interfaçage 203
1 Interfaçage pour la photoporation de cellules adhérentes . . . 203
2 Suivi en temps réel de la dynamique cellulaire en flux . . . 205
3 Contrôle microfluidique . . . 206

F Agrégats cellulaires 207
1 Dissociation par cisaillement . . . 207
2 Préparatifs en amont : ensemencement . . . 208
3 Préparatifs de l'échantillon . . . 208
4 Mise en flux et extraction (cas de la photoporation en flux) . . . 209

G Outils de simulations **211**
1 Approche global du calcul pas à pas . . . 211
1.1 Schéma d'Euler . . . 212
1.2 Schéma de Runge Kutta . . . 216
2 Etablissement du maillage et résoltution des problèmes 3D . . . 223
3 Approche pour la rhéologie en environnement microfluidique . . . 225

H Publication **233**

Bibliographie **235**

Liste des figures **255**

CHAPITRE 1

INTRODUCTION : TRANSFECTION CELLULAIRE PAR PHOTOGÉNÉRATION DE NANOBULLES DE VAPEUR

Préambule :

Dans le contexte de la thérapie génique et de l'amélioration des méthodes de diagnostiques en biologie moléculaire et nano-médecine, une introduction sur les enjeux de la transfection de cellules biologiques est présentée dans ce chapitre. Les techniques sont multiples et variées et peuvent être classées en deux catégories : physiques et "non-physiques". Entre utilisation de vecteurs biologiques ou chimiques et l'introduction de champs physiques extérieurs comme les impulsions électriques ou les champs ondulatoires, la communauté redouble d'effort pour optimiser trois paramètres essentiels dans tout protocole de transfection : le taux de cellules ayant répondu positivement au traitement, le nombre de cellules ayant survécu au traitement et la taille de la molécule transfectée dans les cellules.

La présente introduction est très orientée sur les approches physiques dans la ligne de "The gene was born outside of biology". Un état de l'art non exhaustif est présenté en mettant en avant les principales contraintes, limitations et les développements de techniques de transfection cellulaire de molécules exogènes comme l'ADN.

1 Transfection de cellules vivantes

La transfection de cellules vivantes est un procédé visant à introduire un matériel extérieur à des cellules. Ce matériel peut être un marqueur, un médicament ou un ADN étranger, dans le but de faire exprimer à la cellule un gène en particulier. Ce dernier par exemple, peut être un gène médicament pour réparer des lésions génétiques associées à certaines transformations malignes, pouvant aboutir à des formes de cancer. La transfection est donc la première étape vers ce que l'on appelle la thérapie génique [1].

1.1 Enjeux et problématiques du transfert intracellulaire

Les premières tentatives – non approuvées à l'époque – de thérapie génique *in vivo* datent des années soixante-dix [2]. Ce n'est que durant la décennie 1990 que le potentiel de cette approche a été mis en lumière et a alimenté les recherches [3]. Les essais cliniques – approuvés cette fois – se sont multipliés mais l'efficacité des traitements demeurait basse. La décennie suivante a permis des premiers essais cliniques positifs [2, 4]. Accompagnée par les progrès de la biologie moléculaire et des biotechnologies en générale, la thérapie génique a trouvé plusieurs pathologies d'application au fur et à mesure de l'identification des gènes responsables de ces anomalies, qu'elles soient cancéreuses, cardio-vasculaires, neurologiques ou encore infectieuses [4].

Mais l'intérêt de la transfection ne se limite pas à la thérapie. L'introduction et la libération d'agents actifs de manière ciblée et contrôlée dans des cellules sont des étapes clefs dans nombre de manipulations cellulaires appliquées aussi bien en diagnostique qu'à la recherche. Les agents actifs peuvent être de tous types. Par exemple, dans le but de transfecter ou de reprogrammer une cellule, des molécules d'acide nucléique peuvent y être injectées. Ces éléments de taille de quelques ~ 1 nm à ~ 100 nm ne diffusent pas – ou faiblement – passivement à travers la membrane [5]. Cette dernière est le premier élément principalement limitant l'intégration de telles macromolécules à l'intérieur de la cellule.

Des mécanismes naturels existent tels que l'endocytose qui permettent l'encapsulation de la molécule à intégrer à l'intérieur du cytoplasme de la cellule. Des voies complexes de libération sont suivies pour transférer l'agent exogène aux zones d'intérêt dans la cellule [6, 7]. Cependant, ces voies de transfert peuvent mener jusqu'au compartiment lysosomal où la molécule incorporée peut être dégradée [8, 9].

Les modèles actuels de cellules sont caractérisés par une compartimentation sophistiquée et des structures internes complexes [10, 11]. Les transferts de matériels génétiques se font essentiellement de manière héréditaire et tout échange avec l'extérieur (nutriment, macro-molécule) est sujet à des processus sélectifs [5, 12]. Particulièrement, les mécanismes impliqués dans la traversée de la barrière endosomale restent complexes et représentent un élément limitant supplémentaire à l'efficacité d'incorporation de molécules exogènes [13].

1.2 La transfection par vecteur

Avec une application sur des cellules biologiques vivantes, des techniques pour réaliser l'introduction d'agent exogènes ont été développées prenant en compte le taux de transfection, la viabilité des cellules et l'efficacité d'incorporation en fonction de la taille de la molécule. À titre d'exemple, la technique initialement la plus courante se base sur l'utilisation d'un vecteur viral [14]. Cela consiste à exploiter la capacité des virus à transfecter leur propre patrimoine génétique à des cellules hôtes, celles-ci le dupliquant à l'identique lors de la division cellulaire (les cellules ayant le même patrimoine génétique que la cellule mère). Ces virus sont donc utilisés comme "cheval de Troie" afin de cibler le gène à modifier. La méthode s'avère efficace en matière de rendement

de transfection et le résultat durable.

Malgré un taux élevé de transfection, cette approche a cependant représenté des risques non négligeables en terme de réponse immunitaire et d'oncogénèse [15]. Pour les rétrovirus (virus à ARN doté d'enveloppe) par exemple, il se produit parfois une intégration aléatoire des gènes pouvant endommager les gènes hôtes sains [16]. Pour les adénovirus (virus à ADN dépourvu d'enveloppe avec une grande variabilité), même si la fabrication de protéines désirées est déclenchée, le système immunitaire de l'hôte élimine rapidement les cellules modifiées et inactive leurs nouveaux gènes, sans mentionner le manque de sélectivité à l'instar des rétrovirus [17]. Par ailleurs, même si dans le domaine de la recherche *in vitro*, la production à petite échelle peut s'avérer suffisante, envisager des traitements basés sur ces méthodes dans le milieu clinique nécessiterait le développement de techniques de production et de purification à rendements élevés [18, 19].

L'avantage majeur de l'utilisation de vecteurs viraux, expliquant les efficacités de transfection obtenues, réside dans la réussite de la traversée de l'endosome. Mais les risques toxicologiques complexifient l'usage de ces vecteurs dans les applications de transfection, particulièrement *in vivo*. Par ailleurs, des limitations sur la taille de l'agent exogène ou sur la sélectivité se posent [20, 21]. En outre, des alternatives non-virales sont développées, d'une part dans le but de réduire le risque pour une efficacité améliorée, mais également pour réduire les coûts.

Le mécanisme alternatif est d'engendrer une perméabilisation de la membrane cellulaire afin de traverser les différentes barrières membranaire et endosomale [22]. Des approches chimiques sont développées dans ce but de perméabilisation. Ces vecteurs chimiques peuvent être constitués de lipides ou de polymères. Certaines limites en termes de taille de molécules ou de toxicité persistent, malgré l'utilisation de vecteurs optimisés biodégradables avec une faible réactivité dans l'environnement cytoplasmique [4, 23, 24]. Il est donc pertinent de limiter les vecteurs ou intermédiaires pouvant s'introduire dans le cytoplasme.

2 Transfection par perméabilisation physique

Très similaires aux approches citées ci-dessus, les "biolistiques" utilisent des particules fonctionnalisées comme intermédiaire. Initialement métalliques, ces "projectiles" sont greffées de l'exomolécule d'intérêt et lancés à vitesse élevée pour transperser la membrane cellulaire. Initialement appliquée à des cellules végétales, cette technique a été étendue aux cellules mammifères et particulièrement dans des applications dermatologiques. Malgré de bons taux de transfection et l'utilisation de particules biodégradables pour éliminer les risques liés à l'usage de métaux lourds, l'approche reste coûteuse, très peu viable et la profondeur d'action de ces bombardements très peu contrôlée, limitant les applications à des tissus en mono-couche [23, 25].

La technique de micro-injection consiste à utiliser une micro-pipette en verre modifiée de façon à pouvoir pénétrer la membrane cellulaire pour une incorporation *in situ* [26, 27]. Cette technique offre une importante sélectivité pour l'administration d'exomolécules ainsi que le suivi individuel des cellules étudiées [28]. Cependant, il est nécessaire d'avoir un équipement de micro-manipulateurs et d'objectifs à fort grossissement [29]. Par ailleurs, le rendu dépend grandement de l'habileté de l'opérateur et de son expérience, et le rendement reste très faible puisque les cellules sont traitées individuellement. De plus, le stress induit aux cellules peut entraîner des changements soudains dans l'homéostasie cellulaire (déséquilibre ionique, potentiel...) impactant le taux de transfection [1].

Un intérêt grandissant est aujourd'hui porté aux approches physiques. L'avantage principal de la micro-injection

reste la pénétration directe à l'intérieur du cytoplasme qui permet de traverser un certain nombre de barrières [25, 30]. Des améliorations comme l'implémentation d'une composante fluidique dans un système de micro-aiguille permet d'améliorer les rendements [31]. La composante fluidique peut également être sous la forme de jets de solution d'intérêt à hauts débits transperçant la membrane [32, 33]. L'introduction de ce type d'intermédiaires améliore certes le rendement mais ce dernier reste limité par les vitesses de contrôle [25].

En fait, cette perméabilisation peut être effectuée à l'aide de différents biais. Elle peut par exemple être induite par des champs extérieurs limitant le recours à des vecteurs potentiellement toxiques ou des appareillage extrêmement coûteux. Ces champs extérieurs sont de nature impulsionnelle ou ondulatoire et ont rapidement supplanter certaines techniques établies en *in vivo*.

2.1 Magnétofection et transfert intracellulaire d'ADN

Un premier exemple que l'on peut mentionner est le champ magnétique et son utilisation avec des intermédiaires pour introduire des exomolécules au sein du cytoplasme [25, 34, 35]. Sans induire de perméabilisation à proprement parlé, la magnétofection, très similaire aux méthodes avec des vecteurs, (non-)viraux entre autre, et biolistiques, consiste à utiliser des particules magnétiques fonctionnalisées. Un vecteur y est greffé. L'association est ajoutée à une culture cellulaire sur un support magnétique qui va guider les éléments vers les cellules [36, 37]

Cette sédimentation accélérée garantit que chaque cellule en culture ait adsorbé une particule magnétique muni d'un vecteur de transfection. Par ailleurs, cela permet de réduire les concentrations de réactifs utilisés. Il est possible que certaines particules puissent transpercer le cytoplasme mais l'incorporation se fait ensuite, plus largement, avec les limitations que l'on a décrites dans le cas des techniques utilisant les vecteurs "conventionnels". Malgré de bonnes efficacités de transfection, cette technique reste limitée en terme de rendement et d'application *in vivo* du fait de l'utilisation d'intermédiaire [34–37].

2.2 L'électroporation : la méthode "impulsionnelle"

L'électroporation consiste à créer une différence de potentiel en utilisant une impulsion électrique très brève et de tension élevée [38, 39]. La différence de potentiel est réalisée de part et d'autre de la cellule à l'aide d'électrodes pour rompre sa membrane. Introduite dans les années quatre-vingt, cette technique est très communément utilisée et profite de l'existence d'un seuil du potentiel électrique transmembranaire qui définit la limite de tension pour générer des nanopores dans la membrane cellulaire [26, 40]

Les pores ainsi obtenus, à l'application de l'impulsion électrique, sont réversibles et réparables par la cellule elle-même. En effet, la taille des nanopores obtenus dépend de la différence de potentiel, pour un seuil de potentiel transmembranaire donné [41]. Si les taux d'efficacité sont très intéressants ($\geqslant 75\%$) et la méthode compatible avec la majorité lignées cellulaires, il n'en reste que la variabilité cellule à cellule, notamment pour le seuil transmembranaire, rend l'applicabilité et particulièrement la viabilité du procédé non garantie [26, 41]. Par ailleurs et d'un point de vue pratique, les générateurs d'impulsions électriques suffisamment élevées en tension, pour réaliser la perméabilisation, mais relativement courtes, pour garantir la viabilité, sont complexes à mettre en place.

Avec l'amélioration des techniques de micro- et nano-fabrication, cette technologie d'électroporation a été combinée avec d'autres composantes comme des nano-électrodes dans des canaux microfluidiques. Cela contribue à améliorer les rendements et réduire les endommagements de membranes élevées, le but étant de palier à la mor-

talité cellulaire pendant le traitement [42–44]. Les améliorations sont concrètes mais augmentent la complexité de l'appareillage nécessaire [26].

2.3 Approche rhéologique de l'hydroporation

Si la fluidique a été couplée avec la micro-manipulation et l'électroporation pour en améliorer les rendements, certaines équipes ont exploité les propriétés de l'écoulement microfluidique pour soumettre les cellules à des contraintes mécaniques. L'hydroporation vise à appliquer des contraintes de cisaillement sur des cellules en écoulement pour les étirer dans une direction. Cette déformation génère des pores membranaires permettant l'introduction d'agents exogènes [45, 46].

En combinant une focalisation inertielle et une géométrie avec une intersection ("+"), la puce microfluidique développée permet, avec un rendement élevé ($\sim 1.6 \cdot 10^6$ cell./min), de réaliser des taux de transfection d'environ 90%. De plus, l'incorporation de molécules de taille $\sim 3 - 2 \cdot 10^3$ kDa est réalisée en écoulement avec une viabilité des cellules $\geqslant 80\%$.

La modification du nombre de Reynolds par la variation de débit permet de moduler les contraintes hydrodynamiques appliquées aux cellules, pour s'adapter aux propriétés mécaniques intrinsèques des organismes ciblés [46]. Malgré ce degré de liberté, l'approche reste sélective en terme de lignées cellulaires, puisque tous les types ne présentent pas la même réponse de transfection à l'hydroporation, à viabilité équivalente.

2.4 Sonoporation pour la perméabilisation

D'autres phénomènes se produisant dans les fluides sont exploités pour réaliser la perméabilisation de membranes cellulaires. Les ondes acoustiques d'amplitudes élevées génèrent, dans certaines conditions, des bulles de cavitation en milieu aqueux [23]. Depuis le milieu des années 1990, la sonoporation est, avec l'électroporation, une des méthodes physiques les plus répandues pour réaliser la transfection de cellules biologiques [25].

Éprouvés dans le milieu médical, les ultra-sons sont utilisés également pour induire des contraintes de cisaillement au niveau de la membrane cellulaire [25, 35]. Différentes approches sont développées selon l'intensité des ondes acoustiques, leurs durées ou encore la présence ou non d'agent de contraste. Ces derniers sont généralement des bulles de gaz qui viennent favoriser l'occurrence de phénomènes de cavitation, intermédiaire de perméabilisation [26, 47, 48].

Les pores créés par l'exposition à ce type d'ondes acoustiques restent de tailles raisonnables pour une réparation par les cellules. Cependant, des essais de transfection ont montré des efficacités d'incorporation très peu uniformes. En effet, les concentrations d'agent exogène introduites dans le cytoplasme varient d'un individu à l'autre [25]. D'autant plus qu'une corrélation a été établie entre l'augmentation du taux de transfection et la baisse de la viabilité. Par exemple, un taux de transfection de $\sim 30\%$ est obtenu avec une viabilité de 90% alors qu'un taux de 70%, obtenu par une approche couplée à la fluidique, induit un viabilité de 80% [49, 50].

3 Transfection par interaction lumière-matière

La lumière a toujours trouvé application en biologie notamment avec le développement de la microscopie au 17e siècle. Avec l'évolution des sources lumineuses, particulièrement des lasers et leurs caractéristiques bien particulières – longueur d'onde, durée, énergie – il ne s'agissait plus d'utiliser l'onde électromagnétique de façon

passive pour de l'observation. Déplacement, piégeage, ablation ou encore dénaturation, les lasers ont permis d'introduire le concept de manipulation active de certains éléments biologiques [51].

L'utilisation des sources lumineuses fortement focalisées pour altérer des tissus biologiques trouve ses premières expériences au début du XXe siècle. Rapidement, des faisceaux laser focalisés à l'échelle micrométrique ont servi comme sondes mais aussi comme outils de désactivation de certains éléments de la cellule. Il est vite apparu que l'irradiation d'un micro-organisme avec un faisceau focalisé – de façon localisée ou non – pouvait entraîner, selon la longueur d'onde, des effets irréversibles. Ces derniers apparaissent notamment *via* la hausse de température, à cause de l'absorption du rayonnement par le tissu ou le milieu aqueux environnant [52, 53].

Outre le confinement optique spatial par focalisation, l'invention des lasers à impulsions et le raccourcissement des durées de ces dernières – introduisant un confinement temporel en plus – permettent le dépôt d'une quantité importante d'énergie en des temps très courts et dans un volume très restreint. Cette petite résolution permet de dénaturer certaines organelles cellulaires en dessous du micromètre. La précision obtenue est donc très prometteuse pour améliorer le ciblage de la perméabilisation membranaire [54].

3.1 Perméabilisation par photoporation directe

Ces phénomènes peuvent être liés à des absorptions linéaires ou non-linéaires selon les caractéristiques de l'onde d'excitation. L'irradiation d'un volume de molécules absorbantes comme l'eau au voisinage ou dans les tissus biologiques peut entraîner des transitions électroniques. Selon la longueur d'onde, les niveaux d'énergies électroniques ou vibrationnels sont excités. Ces absorptions peuvent être à un seul ou plusieurs photons selon la durée de l'impulsion laser [55].

Pour des durée de l'ordre de la $\sim$ ns, la relaxation des états excités lors de l'irradiation entraîne une hausse de la température localisée. Selon le temps de montée, la chaleur emmagasinée peut causer une expansion thermique du liquide et par conséquent la génération d'ondes acoustiques. Pour une température suffisamment élevée, le liquide est vaporisé et des bulles de vapeur en cavitation sont créées [55, 56]. Pour des durées très courtes ($\sim$ fs), la focalisation d'un faisceau suffisamment énergétique dans un milieu aqueux absorbant peut induire un plasma d'électrons ou d'ions suite à de l'absorption multi-photons et de l'ionisation en cascade [53, 57]. La densité croissante de ce plasma aboutit par ailleurs à l'émission d'ondes de choc où la génération de bulles de vapeur après rupture optique dans un diélectrique comme eau [58, 59].

Entre hausse de température, émission d'ondes acoustiques ou encore génération d'espèces réactives (par scission moléculaire), différentes sources de dénaturation – thermique, mécanique ou chimique – sont créées par l'irradiation d'un volume en milieu aqueux ou biologique [55, 56]. Effectué au voisinage de membranes cellulaires, cela peut induire une ablation des tissus environnants ou, dans une moindre mesure, leur perméabilisation [51, 58]. Dès les années 1980, l'application à la transfection est expérimentée notamment pour le caractère ciblé et localisé de cette intervention. Outre cet aspect de traitement de la cellule unique contraignant, pour pouvoir déclencher ces phénomènes, le confinement spatio-temporel de l'excitation est nécessaire que cela soit en utilisant des source fs ou très énergétiques, de façon à raccourcir le temps de dépôt d'énergie.

Ces éléments ont poussé à envisager l'introduction d'intermédiaires qui feraient le lien entre l'énergie optique injectée dans le système et la cible qui est la membrane cellulaire. Leur rôle est de baisser l'énergie optique nécessaire pour engendrer la perméabilisation. D'une certaine manière, ces relais vont concentrer l'énergie et ensuite

la ré-émettre au voisinage des membranes. Selon leurs tailles, ils peuvent également améliorer la résolution spatiale du procédé. Leur fonctionnalisation, par ailleurs, peut également rendre cette approche de photoporation tout autant spécifique que la photoporation directe sans la nécessité de confinement spatial [56, 60].

3.2 Photoporation avec intermédiaires plasmoniques

Les intermédiaires plasmoniques sont des nanostructures dont la géométrie et la composition influent sur leur interaction avec une excitation lumineuse à une longueur d'onde donnée. Elles sont généralement métalliques et à l'échelle de la dizaine à centaines de nanomètres. Irradiées par une onde électromagnétique, elles peuvent être excitées par une résonance de plasmons de surface (RPS).

Pour un métal de dimensions macroscopiques données, deux analogies sont possibles quant à ses électrons libres (de valence). On peut considérer les électrons individuellement en mouvement entre les atomes constituant un réseau plus large. On peut également adopter l'approche d'un plasma (fluide) d'électrons de densité élevée et qui est soumis à des fluctuations [61]. Ces oscillations sont considérées comme des quasi-particules appelées "plasmons". La théorie de Maxwell sur l'électromagnétisme permet la propagation d'onde en surface à l'interface entre métal et diélectrique [62]. Les plasmons de surfaces sont ces oscillations cohérentes délocalisées du nuages d'électrons qui se produisent à l'interface entre deux milieux de constantes diélectriques de signes opposés, généralement métallique et diélectrique [63]. Ce mouvement de charges génère généralement un champ électromagnétique atténué dans la direction de propagation suivant l'interface et évanescent dans la direction orthogonale. L'excitation du couple, formé par le champ électromagnétique et les mouvements de charge, avec la fréquence adéquate conduit à une résonance du système, que l'on appelle Résonance de Plasmons de Surface (RPS) [64].

Cependant, le comportement en volume que l'on peut retrouver dans des éléments micrométriques ou plus grands diffèrent de ce qui peut être observé à l'échelle nanométrique, par exemple la différence de couleur entre l'or macroscopique et l'or colloïdal [65, 66]. Le fait que les plasmons de surfaces décroissent exponentiellement dans la direction normale les rend sensibles aux propriétés de surface [61]. Pour une surface donnée, les défauts comme la rugosité modifient la distribution de charges spatialement et l'influence de l'angle d'incidence d'une éventuelle excitation optique par exemple [67]. La résonance des plasmons de surface varie donc selon l'état de surface ou selon la taille de la structure (nanoparticule) [68].

3.2.1 Excitation optique des nanoparticules d'or par résonance de plasmons de surface (RPS)

Une onde électromagnétique incidente qui interagit avec des électrons d'une nanostructure métallique peut produire une RPS localisée. Pour une nanoparticule de taille de l'ordre de l'épaisseur de peau ($\approx 25 - 50$ nm), le champ électromagnétique interagit avec les électrons de conduction et les met en oscillation. Ces déplacements par rapport au centre de la particule modifient la répartition des charges. Le nuage électronique est alors polarisé. Les interactions de Coulomb induisent une force de rappel – avec les ions générés – qui impose alors une fréquence. En utilisant une fréquence proche de celle de ces oscillations, le système entre en résonance plasmon [64, 65].

L'oscillation des plasmons peut se relaxer suivant différents mécanismes. Elle peut générer un champ électromagnétique supplémentaire en champ proche de la nanostructure. Non-linéaire, ce phénomène peut entraîner des effets sur le milieu environnant comme la génération d'un plasma ou des réactions chimiques comme la rupture de liaison et la génération d'espèces par exemple. La relaxation peut également se faire de manière

radiative par l'émission d'un photon si la taille de la nanostructure est importante. Un autre mécanisme de relaxation consiste à exciter des électrons dans la même bande ou dans une bande autre au delà du niveau d'énergie de Fermi. L'amortissement des oscillations est alors non-radiatif et l'énergie est ainsi transmise à des pairs d'électrons-trous dans le réseau constituant la nanoparticule [66, 69].

L'agitation électronique issue de la résonance plasmon induit donc un transfert d'énergie vers le milieu entourant la nanoparticule. Dans le cas de la relaxation non-radiative, le transfert se fait vers les phonons (vibrations du réseau atomique) du métal ($\tau_{ep} \approx 1 - 3$ ps). Ces derniers vont à leur tour transmettre l'énergie aux phonons du milieu environnant ($\tau_{pp} \approx 100$ ps). Les temps caractéristiques des interactions électron-phonon et phonon-phonon conditionnent le dépôt d'énergie, *i.e.* l'impulsion laser, en terme de durée et d'intensité [66].

Une première manifestation de ce transfert d'énergie est la hausse de la température de la nanoparticule et du milieu environnant. Il est notamment question d'un chauffage de quelques dizaines à quelques centaines de degrés [56, 66]. La diffusion thermique a un temps caractéristique de l'ordre de ~ 100 ps. Dans le cas d'une irradiation avec une impulsion $\sim$ ns, une faible portion de l'énergie optique est exploitée avant la dispersion de l'onde par changement d'indice [56, 70]. Au voisinage d'un tissu, il se peut néanmoins qu'il se produise un changement de phase ou une dénaturation des propriétés de ce dernier, particulièrement la perméabilité ou l'hydrophobie de la bi-couche lipidique des membranes cellulaires [56, 71].

Pour une énergie équivalente, une impulsion de l'ordre de la femtoseconde (ultra-courte) peut générer un plasma par des effets non-linéaires. D'une part, les réactions chimiques peuvent générer des espèces réactives d'oxygènes et des radicaux libres responsables de la péroxydation de lipides. À proximité d'une membrane cellulaire, ces phénomènes contribuent à sa perméabilisation [56, 66, 72]. D'autre part, l'amplification du champ électrostatique peut déclencher, *via* le plasma, l'ionisation en cascade qui peut aboutir à la vaporisation de la couche de liquide en contact avec la nanoparticule. Des nano-bulles de vapeur sont ainsi créées [56, 66].

L'allongement de la durée des impulsions laser à la nanoseconde n'exclut pas la génération de nano-bulles de vapeur. Cependant, pour garantir une énergie suffisante, déposée devant les temps caractéristiques de diffusion thermique, l'intensité doit être plus élevée. En effet, la hausse de température doit être suffisamment "soudaine" (centaines à milliers de degrés) pour obtenir un changement de phase explosif ne dépendant pas uniquement de la présence de points de nucléation [56, 66, 73]. Ces nano-bulles sont donc le dernier réservoir d'énergie. Instables, elles contiennent – une partie de – l'énergie de l'onde électromagnétique d'excitation convertie en énergie "mécanique".

3.2.2 Génération de nano-bulles de vapeur (VNB) pour la perméabilisation membranaire

Plusieurs méthodes existent pour générer des bulles en cavitation de différents diamètres : des moyens acoustiques, optiques ou plasmoniques. Le comportement de ces bulles à proximité d'une membrane cellulaire peut créer des nanopores [56]. L'usage d'impulsions ultra-courtes permet de perméabiliser une membrane cellulaire localement en focalisant précisément le faisceau en trois dimensions. Pour multiplier les degrés de liberté, l'usage d'un faisceau de Bessel non diffractant permet de s'affranchir du réglage vertical mais implique que la cellule est complètement irradiée, ce qui peut l'endommager [56, 74, 75]. Les nanoparticules plasmoniques permettent de réduire le seuil de fluence nécessaire à la perméabilisation des membranes pour améliorer la viabilité. En effet, pour une impulsion fs ou ns d'intensité donnée, la génération de nano-bulles se produit thermiquement ou par plasma selon la quantité d'énergie déposée pendant une durée $\propto \tau_{pp}$ ou τ_{ep}.

La dynamique de cavitation qui suit la génération de nano-bulles est un phénomène complexe sur plusieurs échelles (en particulier s'il est créé optiquement) et générant plusieurs événements pouvant induire un stress mécanique [66]. Chronologiquement, la première contrainte acoustique est émise avant la création de la nano-bulle mais 0.1-10 ns après l'irradiation du milieu ou l'excitation de la nanoparticule plasmonique. Elle résulte d'une expansion thermique causée par la hausse de la température [76, 77]. Après sa nucléation, la bulle oscille radialement. Cette alternance de phases d'expansion et d'effondrement (contraction) est accompagnée d'émissions acoustiques importantes mais également de génération de contraintes de cisaillement due au déplacement du fluide entourant la nano-bulle de vapeur cavitante [77–79].

Les phases d'expansion sont limitées temporellement par la tension de surface et la pression interne qui imposent un rayon critique maximal. Commence alors sa contraction qui peut s'achever par une émission d'onde de choc acoustique, une onde de pression ou même la création de nano-jets de liquide. Tout au long de ce processus, et ce dès l'irradiation de l'intermédiaire plasmonique, plusieurs phénomènes se produisent. Ils sont source d'énergies mécaniques et acoustiques qui peuvent contribuer à l'altération de structures telles que les membranes cellulaires. De plus, ils sont accentués en milieux biologiques et dépendent de certaines caractéristiques des nano-bulles en question [77, 78, 80].

Les propriétés des nano-bulles, particulièrement le rayon maximal – et donc la durée de vie – peuvent être contrôlées par le type de la nanoparticule, sa taille et la fluence (intensité du laser) d'excitation. Des paramètres externes, comme la pression dans le milieu ou sa tension de surface, interviennent également [81, 82]. Ces contraintes émises et qui se propagent d'une manière ou d'une autre sont soumises à de la dissipation [83]. Les contraintes sont donc modulables.

4 Efficacité et viabilité de la photoporation

L'excitation par un laser des nanoparticules dans un milieu aqueux entraîne différents mécanismes de dissipation de l'énergie optique selon l'énergie et la durée de l'impulsion à une longueur d'onde donnée. En deçà d'un seuil de fluence, une partie de l'énergie de l'impulsion optique absorbée par les nanoparticules est convertie en chaleur en des temps comparables à la diffusion thermique dans l'eau (photo-thermique). Au delà de ce seuil, l'énergie optique est soit convertie en chaleur et entraîne une hausse de la température en des temps très courts, soit il y a formation d'un plasma. Dans les deux cas, le liquide environnant est vaporisé et une nano-bulle de vapeur se crée (photo-acoustique) [66].

Il s'avère que les deux processus aboutissent à deux performances différentes de photoporation en terme de taux de transfection et d'efficacité d'incorporation. Suivant la fluence d'irradiation de nanoparticules adsorbées à la membrane cellulaire par rapport au seuil de génération de nano-bulles de vapeur, le taux de transfection passe de $\leqslant 50\%$ à $\sim 90\%$ alors que l'efficacité d'incorporation (concentration de l'agent incorporée) augmente d'un facteur ~ 6 avec par exemple l'incorporation de FITC-Dextran 10 kDa [71].

Depuis une trentaine d'années, les effets hydrodynamiques des ondes de chocs et de pressions issus de nano-bulles en cavitation sont étudiés dans le but de les appliquer à la perméabilisation des membranes cellulaires [35, 47, 84–86]. L'irradiation de nanostructures plasmoniques conduisant à la génération de nano-bulles de vapeur permet de contrôler le rayon de ces dernières et donc les contraintes émises. Ce processus est très sélectif à l'étape d'association des intermédiaires plasmoniques aux cellules ciblées. Par ailleurs, outre l'adaptabilité à différentes

lignées cellulaires et à différents types de nanoparticules, cette technique permet aussi l'incorporation de molécule de $\sim$ kDa à $\sim 10^3$ kDa [56, 81].

En utilisant un intermédiaire pour convertir localement l'énergie optique de l'excitation, un contrôle supplémentaire est possible quant aux nombres de nanopores créés et par conséquent la concentration d'agent exogène diffusant à l'intérieur du cytoplasme. Cependant, pour la photoporation de cellules adhérentes par exemple, le protocole comprend une étape de pré-incubation de cellules avec une suspension de nanoparticules. Cela implique l'exposition plus ou moins prolongée des cellules à des matériaux potentiellement cytotoxiques comme les nanoparticules non-irradiées ou leur débris après excitation [87, 88].

Cet argument toxicologique est l'une des principales limitations, particulièrement dans la perspective d'une application *in vivo*. La séparation des phases biologiques et plasmoniques est donc un critère nécessaire à établir pour l'évolution de la photoporation dans le cadre thérapeutique ou diagnostique.

4.1 Cytotoxicité des nanoparticules d'or

Macroscopiquement, l'or est un élément biologiquement inerte. À l'échelle nanométrique, sa cytotoxicité varie selon la taille, le rapport d'aspect, l'état de surface ou encore la charge à la surface des nanoparticules [89–92]. En effet, ces propriétés déterminent l'adsorption mais aussi l'absorption de ces corps étrangers par la cellule *via* des mécanismes d'endocytose par exemple. Des éléments de quelques nanomètres sont comparables à des molécules incorporées par l'endocytose, d'autant plus que les interactions entre les atomes d'or de surface et les composants du cytoplasme sont favorisées par un rapport surface sur volume important [93–95].

L'endocytose, du moins la traversée de la barrière membranaire, est possible pour des molécules de taille jusque 100–1000 nm [96]. En bio-médecine, les nanostructures utilisées varient entre quelques dizaines de nanomètres ($\sim$ 50 nm) à l'ordre du micromètre. Après irradiation, les nanostructures subissent des altérations comme une fusion ou une fragmentation libérant des débris nécessairement plus petits [92–94, 96].

Un des principaux mécanismes influant sur la cytotoxicité est la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) qui induisent un stress oxydant au voisinage comme à l'intérieur du cytoplasme [89, 97]. Ce stress entraîne l'activation de voies de réponse au stress et, dans certains cas, la mort cellulaire par nécrose ou apoptose [98, 99]. Par ailleurs, des modifications du réseau d'actine du cytosquelette peuvent être générées et peuvent ainsi perturber les processus endocytotiques, mais également l'équilibre biomécanique de la cellule [95, 100].

D'une part, les cellules sont potentiellement en présence d'une large gamme de taille de particules plasmoniques plus ou moins toxiques avant et après irradiation. D'autre part, les modèles expérimentaux des études de cytotoxicité des nanoparticules plasmoniques renvoient des résultats avec une grande dispersion. Nombre de ces modèles sont établis sur des cultures de cellules adhérentes. Or, il y a une différence entre les cultures $2D$ et les cultures $3D$ (sphéroïdes), ces dernières plus réalistes pour une projection *in vivo* [101, 102]. Malgré les divergences des études de nanotoxicité, il est cependant établi que les nanoparticules d'or ne sont pas biodégradables [103].

4.2 Transfection de lignées cellulaires par nano-bulles de vapeur

La description de la dynamique des nano-bulles de vapeur après génération autour des nanoparticules rappelle que les contraintes en jeu sont de différents types pendant le phénomène de cavitation. Les membranes sont

soumises à l'oscillation volumique de la bulle qui crée des mouvements de fluide et par conséquent du cisaillement, pendant l'expansion ou l'effondrement. Pendant l'effondrement, une onde de compression est émise de manière sphérique et des nano-jets peuvent être générés selon les distances caractéristiques entre le centre de la nano-bulle et la membrane de la cellule [104–106].

Ces sollicitations mécaniques, fluidiques et acoustiques causent la déformation de la membrane qui peut aboutir, selon sa valeur, à sa perméabilisation. Pour des phénomènes d'onde de pression ou acoustique, il y a une décroissance avec la distance séparant le centre de la bulle – site d'émission – et la membrane. Dans le cas des nano-jets, leur vitesse initiale décroît à cause de la couche de liquide traversée jusqu'à la membrane.

La réponse d'une structure à une contrainte mécanique dépend de ses propriétés élastiques notamment. Le seuil de déformation critique pouvant aboutir à la création de nanopores varie ainsi d'une lignée cellulaire à l'autre [46]. Pour une contrainte donnée – indirectement pour une distance entre nanoparticule et cellule donnée – par rapport à ce seuil, trois cas de figure sont possibles : la membrane n'est pas suffisamment déformée pour être perméabilisée, la déformation conduit à la création de nanopores réparables par la cellule et, enfin, les contraintes sont trop élevées pour la survie de la cellule [83, 107].

La portée non nulle des contraintes permet donc, d'une part, de séparer cellules et nanoparticules, puisque les effets mécaniques sont effectifs même en l'absence de contact. D'autre part, la décroissance avec la distance permet de contrôler le degré de déformation et donc de perméabilisation des membranes cellulaires. Moduler la distance est un moyen d'optimiser la photoporation sur le plan de la tansfection et de la viabilité, tout en la rendant adaptable à chaque lignée cellulaire et ses propriétés mécaniques intrinsèques.

4.3 Génération de nano-bulles de vapeur à distance

La variabilité d'une lignée cellulaire à l'autre et le caractère non bio-dégradable des nanostructures plasmoniques motivent la recherche de nouvelles approches où ces dernières sont séparées tout au long du protocole de photoporation. Deux grands types de solutions peuvent être trouvées dans la littérature : l'utilisation de nanostructures adhérées à un substrat ou la fixation sans contact au voisinage de cellules.

La "greffe" de nanostructures plasmoniques sur un substrat pouvant servir à la culture cellulaire est une première approche permettant d'extraire des cellules après irradiation séparées des nanoparticules. Le réseau d'intermédiaires plasmoniques adsorbé sur un substrat est irradié dans les gammes photo-thermiques ou de génération de "petites" nano-bulles de vapeur pour éviter son altération par une cavitation trop importante [108, 109].

Le substrat utilisé est bio-compatible et permet la fixation des éléments plasmoniques et des cellules pour le traitement. Cette technique réalise de bonne performance de transfection ($\geqslant 80\%$) et solutionne le problème toxicologique potentiellement induit par les nanoparticules. Par ailleurs, la modulation des contraintes est toujours possible en modulant l'intensité du laser de l'irradiation.

Cependant, cette intensité sera limitée par le seuil d'endommagement des nanostructures par la dynamique de cavitation. Il est également à noter que cette approche reste peu compatible avec des lignées en suspension. De plus, La mise en place reste complexe entre les étapes de microfabrication et de culture qui ne garantissent pas l'uniformité de la perméabilisation, *i.e.* la distribution de nano-structures et donc de nanopores n'est pas précise. Dans les gammes d'intensités appliquées, l'efficacité d'incorporation peut être limitée [110].

Une autre configuration statique s'applique à des cellules adhérentes ou en suspension en fixant des nanoparticules au voisinage de cellules à l'aide de pinces optiques, la rendant plus versatile que la dernière [83]. Les nanoparticules sont placées en contrôlant la distance avec les cellules et excitées par une impulsion nanoseconde pour générer des nano-bulles de vapeur. Malgré la séparation de quelques dizaines de micromètres, le taux de transfection obtenu est de l'ordre de $\sim 75\%$ pour un traitement à l'échelle de la cellule unique, ce qui implique un faible rendement de cellules transfectées par unité de temps [111].

Les deux approches ci-dessus répondent favorablement aux contraintes de toxicité et de modulation de contraintes avec cependant quelques limitations. On parle notamment de la fréquence d'événements pendant le traitement (rendement de transfection) puisque l'échantillon destiné à être photoporé n'est pas renouvelé rapidement. Un couplage avec la microfluidique a été réalisé pour augmenter la cadence de traitement en réalisant ce traitement des cellules en flux, pré-incubées avec des "clusters" de nanoparticules et ensuite remises en suspension [112]. Le traitement par un laser 70 ps avec un taux de répétition de 40 Hz permet d'atteindre des efficacités de transfection sélective (déclenchement au passage de cellules marquées) de $\geqslant 90\%$ avec du FITC-Dextran 10 kDa grâce à la génération de nano-bulles de vapeur [112].

L'approche opto-fluidique est intéressante car il n'y a pas de limitation sur l'échantillon biologique. Le dispositif est capable d'accueillir des cellules en suspension ou adhérentes après remise en suspension. La mise en flux, contrairement au support de culture, renouvelle la population de cellules à traiter sans étapes intermédiaires. Seul le taux de répétition du laser (dans le cas d'une irradiation par impulsions) fixe les débits d'écoulement et, par conséquent, la fréquence des événements (nombre de cellules traitées par unité de temps).

Les effets mécaniques des nano-bulles de vapeur générées ont une portée non nulle [83, 107]. Par conséquent, il n'est pas nécessaire de mettre strictement en contact par pré-incubation cellules et nanostructures plasmoniques. Sans l'étape de pré-incubation, la mise en flux des deux phases amplifie la modularité du procédé en introduisant des degrés de liberté comme le type de nanoparticules, leur concentration modulée directement et contrôle de la distance les séparant des membranes cellulaires.

4.4 Intérêt de la microfluidique pour le traitement de cellules biologiques

La microfluidique s'est vite imposée par ces rendements, ces performances et des possibilités de comportement hydrodynamique [113, 114]. Le comportement laminaire des fluides caractérisant l'écoulement microfluidique est possible à bas nombre de Reynolds (Re) qui compare les effets inertiels aux effets visqueux. Il est spécifique par des lignes de courant parallèles non-perturbées [115]. Par exemple, un écoulement à ~ 0.1 m/s dans un canal de dimension caractéristique ~ 100 µm a une nombre de Reynolds $Re \approx 10$.

L'intérêt réside donc dans la stabilité de l'écoulement à des cadences élevées, pertinente dans des applications de comptage ou de tri de flux multiphasiques ou biologiques. Le contrôle de particule en écoulement, fonctionnalité essentielle dans la détection ou le traitement opto-fluidique, est alors possible grâce à des géométries particulières ou des éléments extérieurs que l'on appelle actuateurs. Des techniques passives et actives sont développées pour réaliser des fonctions de déplacement ou de contrôle dans le cadre des recherches autour des laboratoires sur puce [116–119].

Malgré les possibilités d'organisation, de contrôle et de sélectivité, ces techniques ont une mise en place lourde,

nécessitent de l'appareillage supplémentaire (laser, transducteur, fonctionnalisation) ou des géométries particulières et spécifiques. Il existe néanmoins un phénomène largement exploité et éprouvé en cytométrie en flux : la focalisation hydrodynamique. En introduisant des liquides latéraux, le liquide central subit un confinement spatial. La largeur du "flux" central peut alors être modulée directement à géométrie de puce fixée. En modifiant indépendamment les débits des flux latéraux, le positionnement et la focalisation du flux central peuvent être dissymétriques selon l'application et occuper une zone à faible variabilité de vitesse (sur le profil de Poiseuille) [114].

Compatible avec différents régimes de Reynolds, la focalisation permet l'organisation de l'écoulement indépendemment des débits d'injection. Elle s'applique avec des vitesses typiques de la cytométrie en flux ($\sim 1-10$ m/s) dans des géométries microfluidiques simples à reproduire en microfabrication. Quant à la spécificité de l'application biologique, les contraintes de cisaillement sur les cellules peuvent alors être respectée pour optimiser la viabilité [120–122].

La viabilité est un critère important dans les protocoles de transfection. De plus, il varie d'une lignée cellulaire à une autre. Le risque cytotoxique que comporte la présence de nanoparticules métalliques ou leurs débris est un frein supplémentaire pour l'application de la photoporation à certaines lignées ou encore à l'implémentation en thérapie *in vivo*. Cette dernière impose par ailleurs des rendements de transfection élevés pour assurer le traitement de $10^8 - 10^9$ cellules en des temps raisonnables [123, 124]. Une approche optofluidique permet d'une part d'augmenter la cadence de traitement sans altérer la viabilité. D'autre part, elle permet la séparation des cellules et de nanoparticules pour une meilleur viabilité, indépendante de la lignée cellulaire – adhérente ou en suspension – et une compatabilité thérapeutique sans contraintes sur le type de nanoparticules.

5 La photoporation par nano-bulles en flux

Le travail de thèse présenté décrit le développement d'un dispositif opto-fluidique pour réaliser la photoporation de cellules biologiques par intermédiaire de nanoparticules plasmoniques basée sur la génération de nano-bulles de vapeur. Du fait de l'aspect propagatif des contraintes mécaniques et acoustiques, la plus-value apportée par cette approche est l'introduction du contrôle de la distance entre sites de nucléation de nano-bulles de vapeur et membranes cellulaires. D'une part, la photoporation à distance garantie la séparation entre les cellules et des éléments potentiellement cytotoxiques et non-compatibles avec l'application *in vivo* tout au long du traitement par laser. D'autre part, le paramètre de distance, variable en temps réel, rend le traitement compatible selon les caractéristiques mécaniques des cellules tant pour la transfection que pour la viabilité, les deux grandeurs décrivant la performances d'un procédé de transfection.

L'utilisation de la technologie microfluidique permet d'appliquer la photoporation tant à des lignées cellulaires en suspension qu'à des lignées adhérentes. Par ailleurs, aucune contrainte de type ou de taille n'est imposée sur les nanostructures plasmoniques à partir du moment où elles sont en suspension. Enfin, selon le type d'irradiation utilisée (en particulier sa fréquence de répétition s'il s'agit d'une source impulsionnelle), la cadence de traitement par photoporation en flux est contrôlable par les débits d'injection et peut potentiellement atteindre $10^2 - 10^4$ cell./s [56, 112].

La première étape de cette étude consiste, à partir d'une source émettant des impulsions de $4-5$ ns à 532 nm, à concevoir et créer un dispositif optique réalisant la photoporation de cellules adhérentes par génération de nano-bulles de vapeur (Chapitre 2). Les performances de l'appareillage sont décrites par trois grandeurs principales. Le premier critère est la fraction positive qui compare le nombre de cellules ayant incorporé la molécule

exogène par photoporation au nombre de cellules total. Le deuxième critère est la viabilité pour décrire l'impact de l'irradiation des nanoparticules d'or sur les cellules traitées. Enfin, le troisième critère est l'efficacité d'incorporation de molécules présentes dans le cytoplasme après perméabilisation de la membrane.

Une étude systématique de ces critères est réalisée pour différents essais de photoporation en variant les paramètres d'intérêt (concentration de nanoparticules et intensité de l'onde d'irradiation). La quantification des résultats est faite à partir de l'analyse d'image par microscopie de fluorescence. La perméabilisation des membranes cellulaires est suivie grâce à une molécule fluorescente (FITC-Dextran 10 kDa). Les échantillons traités sont analysés en terme de croissance et de fluorescence émise, le but étant de déterminer le seuil d'intensité pour la génération de nano-bulles de vapeur dans nos conditions expérimentales. Cette étape a été indispensable pour exploiter la portée de ce phénomène dans la transfection à distance.

En se basant sur la focalisation hydrodynamique, le protocole de photoporation est adapté en flux en utilisant des cellules adhérentes remises en suspension et en maintenant les mêmes conditions d'irradiation des nanoparticules (Chapitre 3). Dans un premier temps, ces dernières sont injectées *via* la suspension cellulaire sans favoriser l'adsorption (sans contact). La focalisation réalise l'alignement de la suspension pour être en adéquation avec la géométrie du faisceau laser de photoporation. Les débits sont alors adaptés au taux de répétition du laser et au nombre d'impulsions appliquées à l'échantillon en écoulement. Une étude systématique de ces paramètres opto-fluidiques et des concentrations des nanoparticules est menée suivant les mêmes procédures établies lors du Chapitre 2.

La transition vers le système opto-fluidique sert d'une part à évaluer l'effet d'un confinement géométrique (canaux microfluidiques) sur les effets des nano-bulles sur les cellules, dont la génération a été établie par la photoporation de cellules adhérentes dans les conditions optiques exploitée. D'autre part, les écoulements microfluidiques introduisent de nouvelles contraintes de cisaillement pouvant être au dépend de la viabilité des cellules. Enfin, la variation de nombre d'impulsions et de la concentration de nanoparticules a permis d'optimiser les performances de la photoporation sans contact en terme de fraction positive et de viabilité cellulaire.

La focalisation hydrodynamique est utilisée pour le contrôle spatial des flux de cellules et de nanoparticules (Chapitre 4). Des études numériques se basant sur la méthode des éléments finis et expérimentales sont effectuées sur l'écoulement bi-phasique dans le cas d'une géométrie de focalisation avec un ou deux niveaux et dans un ou deux plans. La focalisation permet de modifier la distance entre le front de nanoparticules en écoulement et le flux porteur de cellules en suspension en modifiant simplement les débits d'injection des différents flux porteurs.

L'approche numérique est ainsi validée sur une géométrie test qui a conduit au design et à la fabrication d'une puce microfluidique pouvant réaliser le contrôle directe et précis de la distance entre la suspension de nanoparticules et la suspension de cellules pendant l'irradiation par laser.

Plusieurs approches – toutes basées sur la focalisation hydrodynamique – sont testées et évaluées pour la photoporation à distance selon la fraction positive, la viabilité et l'efficacité d'incorporation (Chapitre 5). L'approche la plus optimale en terme de stabilité et de viabilité est retenue et elle consiste en l'utilisation d'un flux séparateur pour le contrôle de la distance entre cellules et nanoparticules.

CHAPITRE 2

PHOTOPORATION DE CELLULES ADHÉRENTES

Préambule :

Ce chapitre décrit le développement d'un banc optique et d'un protocole biologique pour la photoporation par nano-bulles de vapeur.

La photoporation utilise la résonance de plasmons de surface en excitant optiquement des nanostructures plasmoniques. Les nanoparticules d'or sphériques, sont excitées optiquement alors qu'elles sont en contact avec des cellules biologiques. Elles dissipent l'énergie optique de l'onde d'excitation soit par génération de nano-bulles soit par dissipation thermique. Le mode de dissipation est déterminé par la valeur de la fluence lumineuse (intensité optique $\mathrm{J/cm^2}$*) de l'impulsion laser par rapport à un seuil.*

Ce seuil de fluence est défini quantitativement et comparé aux données de la littérature en développant un banc optique et les protocoles biologiques pour l'incorporation de molécules exogènes. Ce développement intègre les paramètres clefs de la photoporation par l'intermédiaire de nanoparticules plasmoniques de cellules adhérentes.

L'irradiation par laser des échantillons d'intérêt est semi-automatisé par interfaçage de l'impulsion laser, de la translation de l'échantillon et de la prise d'images. L'évaluation du traitement est faite via la prise d'image par microscopie à différentes étapes du protocole. Une analyse quantitative de la fluorescence, issue de l'incorporation de la molécule de référence permet de confirmer la création de nano-pores pour la perméabilisation (et donc la transfection).

1 Mécanismes de photoporation avec intermédiaires plasmoniques

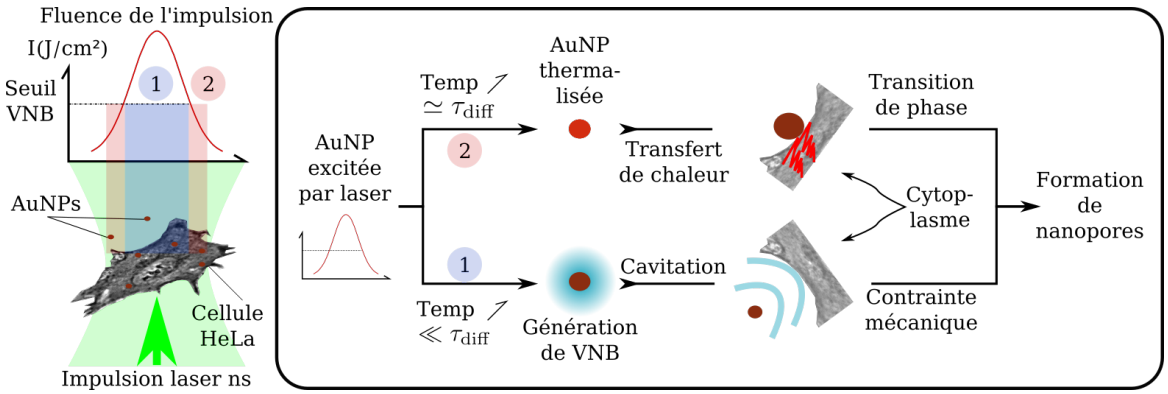
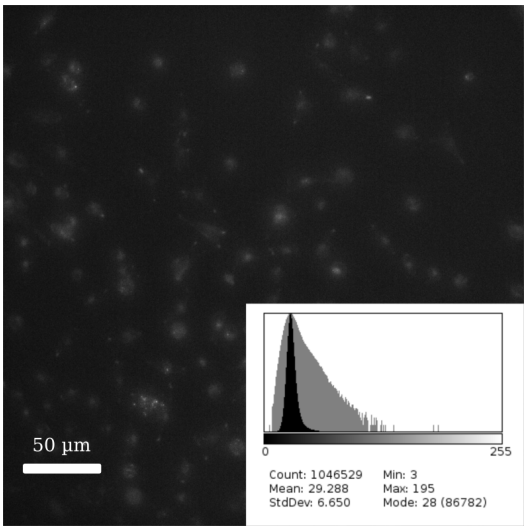


FIGURE 2.1 – **Principaux mécanismes de la photoporation avec nanoparticules d'or (AuNP) de cellules biologiques.**
Selon l'énergie (fluence : J/cm^2) apportée à l'AuNP, deux phénomènes principaux peuvent se produire. Le premier est une hausse de température (Temp.) de l'AuNP qui cause une transition de phase locale de la membrane cellulaire. Les ruptures de liaisons qui en résultent forment des nanopores. Le second, par hausse très rapide de la température ou création d'un plasma, résultant en la génération d'une nano-bulle de vapeur (VNB) en cavitation qui appliquent des forces de cisaillement pendant son oscillation et émet une onde de choc à son effondrement. Ces contraintes mécaniques altèrent la membranes pour créer des nanopores.

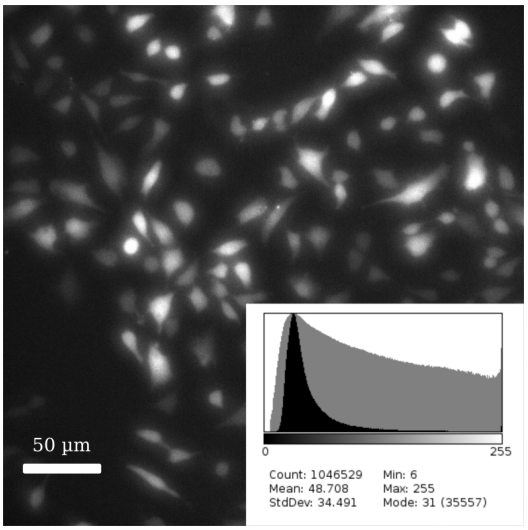
La photoporation par l'intermédiaire de nanoparticules plasmoniques utilise la résonance de plasmons de surface (RPS). L'excitation par un laser des nanoparticules plasmoniques dans un milieu aqueux entraîne différents mécanismes de dissipation de l'énergie optique selon l'énergie et la durée de l'impulsion à une longueur d'onde donnée. En deçà d'un seuil de fluence, une partie de l'énergie de l'impulsion optique absorbée par les nanoparticules est convertie en chaleur en des temps comparables ($\sim$ 100 ps) à la diffusion thermique dans l'eau (photo-thermique). Au delà de ce seuil, l'énergie optique est soit convertie en chaleur qui résulte en une hausse de la température en des temps très courts ($\ll$ 100 ps), soit il y a formation d'un plasma. Dans les deux cas, le liquide environnant est vaporisé et une nano-bulle de vapeur se crée (photo-acoustique) [56, 66].

La photoporation de cellules adhérentes consiste à exciter les nanoparticules au voisinage des membranes cellulaires. Les nanopores obtenus thermiquement ou acoustiquement permettent la perméabilisation de la membrane et la diffusion de molécule à l'intérieur du cytoplasme (fig. 2.1). Le phénomène photo-thermique implique une transition de phase de la bi-couche lipidique par la chaleur générée. Ce phénomène est d'autant plus efficace dans le cas où les nanoparticules sont adsorbées aux membranes des cellules. Le phénomène photo-acoustique crée des efforts de cisaillement et des ondes de chocs. Ce stress mécanique peut se propager et par conséquent induire des dommages aux membranes.

Les nanoparticules d'or sont ainsi des sites de création de nanopores. Leur nombre influe sur la perméabilisation des membranes cellulaires que le phénomène soit thermique ou par génération de nano-bulles de vapeur. Il permet aussi de quantifier l'ampleur de la perméabilisation en considérant son rayon effectif, en l'occurrence la prise en compte de la taille des nanopores créés et leur nombre [110]. Par conséquent, la modification du nombre d'intermédiaires plasmoniques (nanoparticules) adsorbés aux cellules entraîne des changements à la fois dans les mécanismes de diffusion de l'exomolécule dans le cytoplasme mais aussi dans le processus de réparation des membranes. L'efficacité d'incorporation d'exomolécules et la viabilité des cellules mesurées après irradiation dépendent donc de la concentration de nanoparticules utilisée.



(a) Cellules cancéreuses HeLa en contact avec la macromolécule en concentration nominale pendant 24 h.



(b) Cellules cancéreuses HeLa traitées par photoporation : fluorescence intracellulaire de la macromolécule incorporée (visualisée après 24 h).

FIGURE 2.2 – **Différence entre incorporation passive et active *via* des nanopores d'une macromolécule sur des cellules cancéreuses HeLa WT par imagerie de la fluorescence FITC-Dextran.**
Les distributions des niveaux d'intensité de fluorescence sont représentées par les histogrammes en vignette. Les noirs et grisés sont respectivement en échelle linéaire et logarithmique sur les niveaux de gris. Les deux champs ont la même densité de cellules. **Fig.a)** L'échantillon est laissé pendant 24 h dans du milieu de culture complet où a été dissoute la macromolécule à la concentration nominale de 2 mg/ml (concentration utilisée pour le protocole "actif" de photoporation [71]). Outre le faible signal (intensité moyenne $\sim$ 30 u.a.), on peut remarquer l'hétérogénéité de la fluorescence au sein du cytoplasme. **Fig.b)** L'échantillon est traité par photoporation en boîte de culture dans du milieu de culture complet où a été dissoute la macromolécule à la concentration nominale et rincé quelques minutes après l'opération. 24 h après le traitement laser, la visualisation s'est faite dans les mêmes conditions. L'intensité est plus élevée ($\sim$ 50 u.a.) et le cytoplasme uniformément marqué. Une molécule de taille de 10 kDa permet de discriminer facilement les deux phénomènes passif et actif.

À faible fluence d'excitation des nanoparticules d'or, les nanopores sont créés par dénaturation thermique. La hausse locale de température est suivie par une diffusion de la chaleur qui diminue la viabilité. Cette hyperthermie localisée est ainsi utilisée en thérapie pour induire la mort cellulaire [93]. Par ailleurs, la fraction positive obtenue par mécanisme photo-thermique de perméabilisation est inférieure à $\sim 50\%$. En comparaison, pour une fluence supérieure, la génération de nano-bulles perméabilise la membrane mécaniquement par émission d'une onde de choc ou application de cisaillement. Les fractions positives ainsi obtenues sont supérieures à $\sim 60\%$ et des efficacités d'incorporation plus importantes avec une fluorescence intracellulaire moyenne $\sim$ 2 fois plus intense [71].

Les temps de vie courts des nano-bulles ($\sim$ µs) devant les temps caractéristiques de diffusion thermique limitent les effets d'hyperthermie. Les contraintes mécaniques (pression émise) modulées par la fluence laser génèrent des nanopores de diamètre de quelques dizaines de nanomètres réparables rapidement après $\sim$ 1 min par la cellule [56, 110]. Ces éléments font de la photoporation par nano-bulles un moyen de transfection de cellules biologiques avec une bonne viabilité ($\approx 90\%$) [71]. Par ailleurs, la taille de ces nano-bulles de l'ordre de $\sim 0.1 - 10$ µm et la propagation d'onde de choc permettent l'altération de la membrane sans nécessité de contact contrairement à la perméabilisation photo-thermique [81]. Cet aspect est nécessaire pour la réalisation de la photoporation où les cellules et les nanoparticules sont séparées.

Sans perméabilisation, une incorporation passive existe à travers la membrane (endocytose) sans risque pour la viabilité. Par exemple, le FITC-Dextran 10 kDa, un polymère associé à un fluorochrome, est incorporé à travers la membrane après 40 min à 37 °C. Le marquage de la cellule est peu uniforme avec la création de "foyers" d'incorporation et d'intensité moyenne de fluorescence $\approx$ 30 u.a. (fig. 2.2a) [125]. L'endocytose passive a une cinétique très lente et ne garantit pas le passage au travers de la barrière endoplasmique des molécules exogènes. Elles restent alors piégées dans des vésicules [6]. En revanche, les nanopores créés par photoporation plasmonique génèrent un marquage uniforme du cytoplasme avec une intensité moyenne de fluorescence environ deux fois plus importante (fig. 2.2b). Les deux phénomènes plasmoniques (thermique et par génération de nano-bulles de vapeur, fig.2.1) induisent des incorporations sur des temps caractéristiques plus courts qui dépendent du gradient de concentration et des potentiels phénomènes hydrodynamiques dûs aux nano-bulles [112]. Typiquement, avec ~ 8 nanoparticules de 70 nm de diamètre par cellules, l'incorporation du FITC-Dextran 10 kDa est réalisée en $\sim 2-3\,\text{min}$ [71].

Les paramètres clefs pour la perméabilisation de cellules par photoporation par intermédiaires plasmoniques sont la fluence du laser d'excitation, le nombre de nanoparticules adsorbées aux cellules et la concentration de la

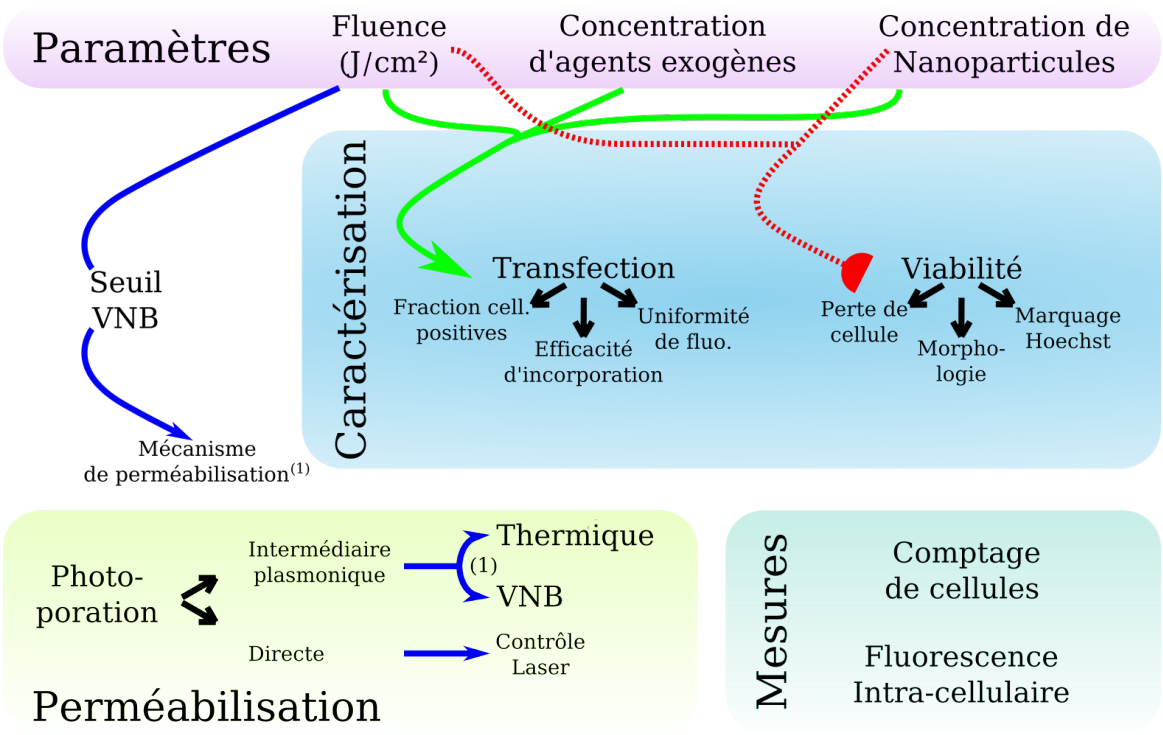


FIGURE 2.3 – **Paramètres clefs de la photoporation et principaux critères.**
La perméabilisation de cellules biologiques peut être réalisée directement en irradiant l'échantillon par un laser (photoporation directe) à condition que la fluence soit élevée ce qui peut nuire à la viabilité (à fluence nominale, elle sert de contrôle). L'introduction d'intermédiaires plasmoniques (nanoparticules d'or) permet d'optimiser l'énergie optique et par conséquent de diminuer le seuil de fluence nécessaire à la génération de nano-bulles de vapeur (VNB). En deçà du seuil, les nanoparticules d'or dénaturent thermiquement la membrane cellulaire. Si la fluence est supérieure au seuil, il se produit la génération de VNB. Plus la fluence est élevée, plus la transfection est améliorée dans la limite de viabilité des cellules. De même l'augmentation du nombre de nanoparticules par cellules améliore la transfection mais constitue un risque pour la viabilité des cellules. La caractérisation de la transfection est faite par la mesure et la quantification de la fluorescence dans les échantillons étudiés (incorporation, intensité, dispersion). Parallèlement, la viabilité est décrite par l'évolution du nombre de cellules, leur morphologie en mesurant géometriquement leur circularité en lumière blanche et leur réponse au marquage Hoechst *via* l'intensité d'émission. Les deux aspects d'incorporation et de viabilité sont donc mesurés par un comptage des cellules et la mesure des fluorescences intracellulaires.

molécule exogène à incorporer (fig.2.3). Dans ce cadre, les performances de la photoporation sont estimées par deux critères : la qualité de la transfection et la viabilité. Chaque paramètre influe en limitant (liaison rouge) ou en améliorant (liaison verte) un de ces deux critères (fig.2.3). Leur évaluation se base essentiellement sur la description des cellules traitées :

- quelle est la fraction de cellules ayant incorporé la molécule exogène ;
- quelle quantité de cette molécule est incorporée ;
- avec quelle homogénéité à l'échelle de la cellule ;
- et enfin, combien de cellules n'ont pas survécu au traitement.

Cette caractérisation est alors réalisée, *via* la prise d'images, en dénombrant les cellules et en mesurant leur fluorescence intracellulaire. La comparaison par ces deux mesures des fractions positives, des fluorescences intracellulaires et du taux de viabilité avec la littérature vise à confirmer la création de nano-bulles de vapeur pendant le processus de photoporation réalisé sur le dispositif opto-fluidique développé.

2 Matériels et Méthodes : dispositif et protocole de photoporation

La photoporation de cellules biologiques par génération de nano-bulles de vapeur nécessite un appareillage optique et un protocole biologique définis. Le montage optique vise à irradier un échantillon avec les bons paramètres optiques (longueur d'onde, fluence, durée de l'impulsion) pour réaliser la résonance de plasmons de surface (RPS) et générer des nano-bulles de vapeur en prenant en compte la viabilité biologique. Les manipulations biologiques consistent à intégrer les intermédiaires plasmoniques avant irradiation, introduire l'exomolécule dans le milieu et préparer l'échantillon après photoporation pour l'analyse. Cette analyse s'effectue par imagerie en fluorescence pour décrire les performances de la photoporation. Cette caractérisation quantitative implique le traitement d'échantillons importants. La cadence de photoporation est donc accélérée par rapport à la durée de vie des nanopores pour réduire cette variabilité en réalisant une synchronisation et une automatisation des éléments du dispositif expérimental (laser, mouvement de l'échantillon, imagerie).

2.1 Préparation de l'échantillon biologique

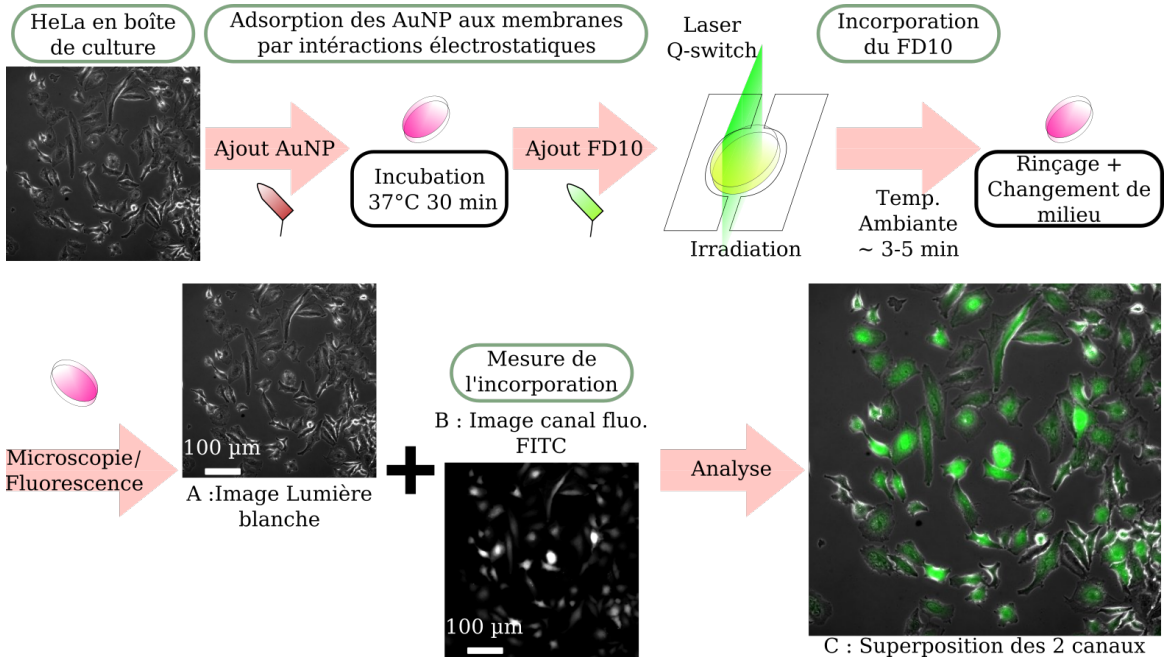


FIGURE 2.4 – **Préparation et traitement de cellules adhérentes par photoporation.**
Après rinçage des cellules HeLa adhérentes (image **A** en lumière blanche), une suspension de nanoparticules d'or (AuNP) dans du milieu complet à une concentration de 8×10^7part./ml est ajoutée à l'échantillon. Après 30 min en incubateur(37 °C, 5% CO_2), des AuNP (chargées positivement) s'adsorbent à la membrane cellulaire par interaction électrostatique. L'échantillon est alors rincé pour éliminer les AuNP en excès et 2 ml de milieu avec du FITC-Dextran 10 kDa à 2mg/ml ajouté (FD10). Les cellules sont ensuite irradiées avec un laser Q-switch (taux de répétition 10 Hz,$I_{\max} \approx 2.6$J/cm^2) et rincées après réparation des nanopores ($\approx$ 5 min) pour améliorer le rapport signal sur bruit pendant l'imagerie en fluorescence des cellules photoporées (image **B**). La corrélation des deux canaux, lumière blanche et fluorescence (image **C**), permet l'analyse des performances de photoporation.

La lignée cellulaire HeLa WT sont des cellules cancéreuse issues d'un prélèvement de métastase suite à un cancer du col de l'utérus. Elles sont couramment utilisées en recherche médicale et biologie cellulaire, ce qui en fait un modèle cellulaire immortalisé bien référencé dans la littérature. Cette lignée est maintenue dans du milieu de culture complet en flasque 75 cm^2 dans 10 ml de milieu complet à base de milieu Eagle modifié de Dulbecco contenant 4.5 g/l de glucose, L-glutamine, penicilline-streptomycine et du sérum fœtal de veau

(DMEM(+ + +)). En préparation de traitement par photoporation, les sous-échantillons sont remis en culture dans des boîtes de culture à fond de verre deux jours avant manipulation (fig.2.4).

Des nanoparticules d'or sphériques de 70 nm de diamètre chargées positivement (Nanopartz) sont conditionnées en suspension dans de l'eau dé-ionisée à une concentration $\times 100$. Elles sont diluées dans du DMEM(+ + +) et ajoutées avant une étape de pré-incubation de 30 min à 37 °C [71]. Des interactions électrostatiques dues aux différences de charge fixent les nanoparticules aux membranes cellulaires. Un rinçage de tampon phosphate salin sans calcium ni magnésium (DPBS(- - -)) élimine l'excédent de nanoparticules n'ayant pas été adsorbées aux membranes. Pour une concentration initiale de nanoparticules d'or de 8×10^7part./ml, environ 8 particules sont fixées par cellule. L'augmentation de la concentration de la suspension initiale augmente le nombre de nanoparticules adsorbées aux membranes [71].

Les cellules sont alors remises en milieu de culture DMEM(+ + +) contenant 2 mg/ml de Fluoresceine Isothiocyanate-Dextran 10 kDa (conjugaison entre FITC, un fluorochrome, et un polymère de glucose anhydre). Plusieurs éléments justifient l'usage de cette molécule. Le délai entre l'ajout de la solution et le traitement n'est pas critique vu la taille du FITC-dextran (endocytose lente ~ 40 min fig.2.2). Pour émettre de la fluorescence, cette molécule n'a pas besoin d'être intégrée dans le noyau ou exprimée par la cellule. Dès sa diffusion dans le cytoplasme à travers les nanopores créés, elle est détectable en fluorescence et l'évaluation de la photoporation quasi immédiate.

2.2 Excitation optique des nanoparticules d'or par résonance de plasmons de surface

Une onde électromagnétique incidente qui interagit avec des électrons d'une nano-structure métallique peut produire la résonance de plasmons de surface (RPS). Pour une nanoparticule de taille de l'ordre de l'épaisseur de peau (≈ 25 nm), le champ électromagnétique interagit avec les électrons de conduction et les met en oscillation : le nuage électronique est alors polarisé et subit une force de rappel par les ions générés.

L'agitation électronique induit un transfert d'énergie vers les phonons (vibrations du réseau atomique) du métal ($\tau_{ep} \approx 1 - 3$ ps). Ces derniers vont à leur tour transmettre l'énergie aux phonons du milieu environnant ($\tau_{pp} \approx 100$ ps). Les temps caractéristiques des interactions électron-phonon et phonon-phonon conditionnent le dépôt d'énergie, *i.e.* l'impulsion laser, en terme de durée et d'intensité. Pour une impulsion fs ou ns d'intensité donnée, la génération de nano-bulles se produit thermiquement ou par plasma selon la quantité d'énergie déposée pendant une durée de l'ordre de τ_{pp} ou τ_{ep} [66].

Dans le cas d'une impulsion de quelques nanosecondes de durée (4-5 ns) à 561 nm utilisée dans cette expérience, des nano-bulles de vapeur sont générées autour de nanoparticules d'or de 70 nm de diamètre à partir d'une fluence de ~ 1 J/cm^2. En augmentant la fluence, la taille des nano-bulles et par conséquent les contraintes induites par la cavitation sur les tissus croissent. Pour intégrer une macromolécule en solution de rayon $\sim 2 - 100$ nm dans des cellules HeLa par exemple, l'optimum se trouve entre 2 et 4 J/cm^2 [71, 126].

Dans le cadre de ces études, un laser de type Q-switch émet des impulsions laser de quelques nanosecondes (Surelite II 10 Hz avec un cristal Nd : YAG). Des cristaux de génération de deuxième et troisième harmonique convertissent la longueur d'onde de 1064 nm en 532 et 355 nm successivement. Le 1064 nm sert à pomper un Oscillateur Paramétrique Optique (O.P.O) permettant de produire deux ondes de fréquences inférieures : un

signal et un idler (complément en annexe A).

L'O.P.O permet d'obtenir une longueur d'onde d'excitation modulable à 561 nm, une fréquence voisine de la fréquence RPS des nanoparticules [71]. Cependant, la puissance limitée ($\sim$ 0.1 W) impose de focaliser le faisceau sur des dimensions de l'ordre du millimètre pour garantir la fluence nécessaire à la photoporation. La source à 532 nm directement après l'étape de doublage de la fréquence de pompe du laser permet quant à elle d'accéder à des puissances optiques plus importantes ($\sim$ 1 W). Elle fournit les intensités requises par la photoporation par nano-bulles de vapeur à une longueur d'onde voisine du pic RPS des nanoparticules d'or utilisées. En effet, le pic à 546 nm mesuré par le fabriquant a une largeur à mi-hauteur de $\sim$ 100 nm permettant une bonne excitation même en décalant la longueur d'onde d'irradiation [127].

2.2.1 Contraintes de fluence pour le laser de photoporation

La cadence temporelle de photoporation est limitée par le taux de répétition du laser Q-switch utilisé (au maximum 10 Hz). L'optimisation du nombre de cellules irradiées par unité de temps peut être faite en couvrant la surface la plus grande possible par une impulsion laser. Un faisceau laser circulaire avec un diamètre comparable à la zone de culture ($\sim$ 2 cm) permet par exemple d'irradier tout l'échantillon avec une impulsion. Cependant, le seuil de génération de nano-bulles ($\approx 1-2$ J/cm^2) avec un faisceau circulaire de diamètre $\sim$ 1 cm n'est réalisable qu'avec une puissance $P_{\mathrm{VNB}} \propto 20$ W, trop élevée pour être délivrée par le Q-switch utilisé. Pour des puissances de l'ordre de $\sim$ 1 W, le faisceau circulaire doit avoir un diamètre d'environ $\sim$ 2 mm et balayer la boîte de culture.

Pour réduire la distance parcourue entre chaque position, une géométrie elliptique est choisie. D'une part, la vitesse de translation de la platine reste modérée et les phases d'accélération sont de courtes durée (en comparaison avec les temporalités d'interfaçage). D'autre part, la réduction de la largeur du faisceau circulaire de $\sim$ 1 cm (dans une seule direction) d'un facteur $\sim 50-100$ ramène la puissance nécessaire à $\propto 0.2-0.4$ W dans la gamme fournie par le laser. Ainsi, un faisceau de cette géométrie de dimensions $\propto 1$ cm $\times 0.01$ cm recouvre la longueur de l'échantillon en une impulsion. Un balayage suivant le taux de répétition du laser par translation de l'échantillon dans la direction perpendiculaire permet la photoporation de la boite de culture en $\sim$ 14 s. Pour une boîte de culture de confluence moyenne ($\sim$ 50% de la surface recouverte par des cellules), cette approche irradie $\sim 2-5\cdot 10^3$ cell./s.

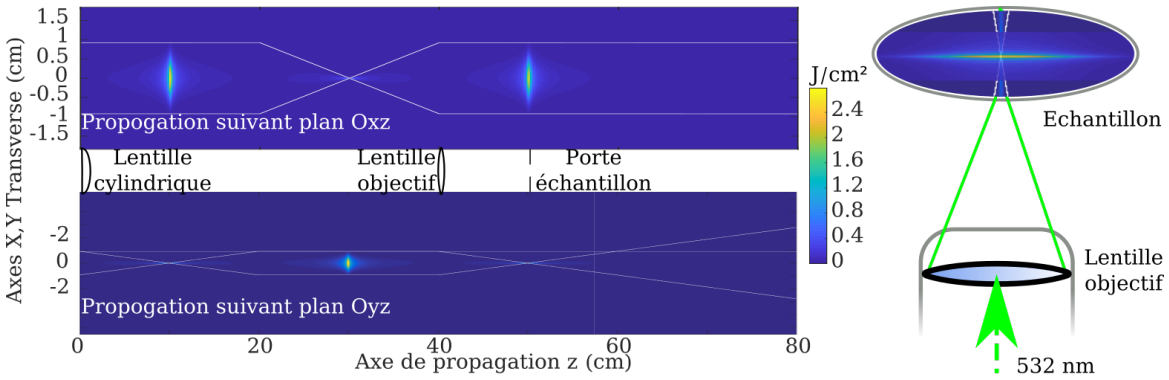
Ces gammes de puissances requièrent des composants optiques spécifiques. Ces éléments, comme les cubes séparateurs polarisants, ont une ouverture utile de 1.8-2 cm (taille utile du composant) qui impose une limite haute au diamètre du faisceau utilisé et donc à la longueur du grand axe du faisceau elliptique sur l'échantillon. Le faisceau est d'environ $\sim$ 0.6 cm de diamètre en sortie de la pompe optique (voir fig.A.2a et b en annexe A). Un télescope keplérien de rapport 3 étend le faisceau circulaire (de 0.6 en $1/e^2$ à 1.8 cm) avant la modification dans une unique direction (voir fig.2.5a) pour réaliser une géométrie elliptique.

La fluence est calculée tout au long du chemin optique en modélisant la propagation d'un faisceau réel à travers un milieu (air, lentille) à l'aide des matrices $ABCD$:

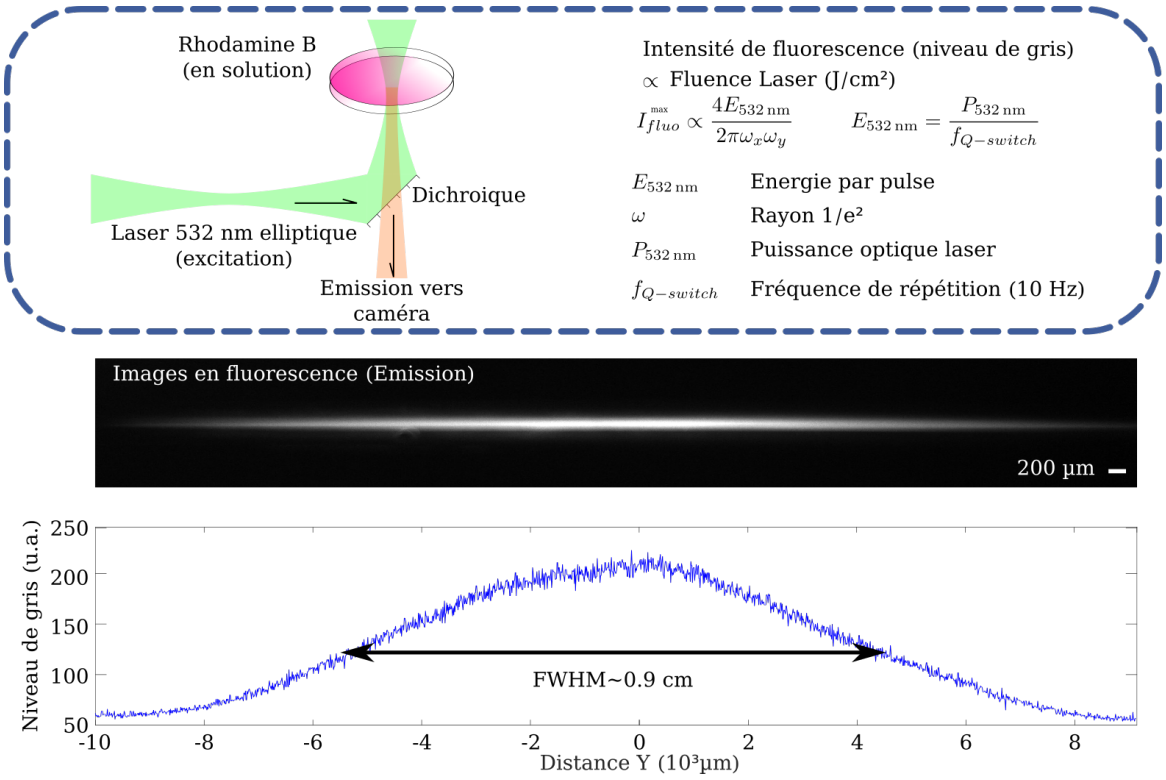
$$q_f(z) = \frac{A * q_i(z) + B}{C * q_i(z) + D} \quad \text{avec} \quad A,\ B,\ C \text{ et } D \text{ les éléments de la matrice du milieu de propagation } \begin{bmatrix} A & B \\ C & D \end{bmatrix}$$

et q_i et q_f respectivement les rayons complexes avant et après le milieu de propagation

tels que $\frac{1}{q(z)} = \frac{1}{R(z)} + \frac{i \cdot \lambda_{\text{réel}}}{\pi * \omega^2(z)}$ où $R(z)$ le rayon de courbure du front d'onde d'un faisceau gaussien $\omega(z)$ le rayon (waist) du faisceau, $\lambda_{\text{réel}} = \lambda \cdot M^2$ la longueur d'onde corrigée pour un faisceau réel M^2 Le facteur comparant la divergence dans le cas d'un faisceau réel et d'un faisceau gaussien



(a) Simulation de propagation du faisceau de photoporation ($M^2 \approx 60$) et cartographie de l'intensité à partir du télescope.



(b) Profil d'excitation avec le laser de la Rhodamine B en solution dans une boîte de culture.

FIGURE 2.5 – **Profil spatial du laser de photoporation.**
Fig.a) Le calcul de propagation est effectué sur un faisceau ayant pour waist initial ω du laser Q-switch et traversant un télescope de rapport 1 : 3. Le rayon complexe $q(z)$ du faisceau de photoporation ($M^2 \approx 60$) est calculé le long de la propagation jusqu'à l'échantillon. La fluence est également simulée le long de l'axe optique en utilisant les matrices $ABCD$ pour chaque milieu de propagation. **Fig.b)** Expérimental : Cartographie de la fluence (profil spatial) en utilisant de la Rhodamine B (fluorophore excité à 545 nm avec une émission à 566 nm) en solution dans une boîte de culture. Le profil de niveau de gris dépend de la fluence locale

La cartographie numérique de la fluence définit des zones avec des valeurs élevées (focalisation du faisceau) pouvant causer des endommagements d'optiques (script en annexe A). Le choix des optiques et de leurs emplacements est fait selon leur seuil d'endommagement induit par laser (fig.2.5). En injectant $P_{\text{opt.}} = 500 \pm 15$ mW (voir fig.A.2d en annexe A), le faisceau de largeur à mi-hauteur (FWHM) 148 ± 14 µm a un maximum de fluence à 2.6 ± 0.36 J/cm^2 au niveau de l'échantillon à photoporer (valeur prise pour une longueur à mi-hauteur simulée de ~ 1.1 cm).

2.2.2 Mise en forme du faisceau optique pour la photoporation

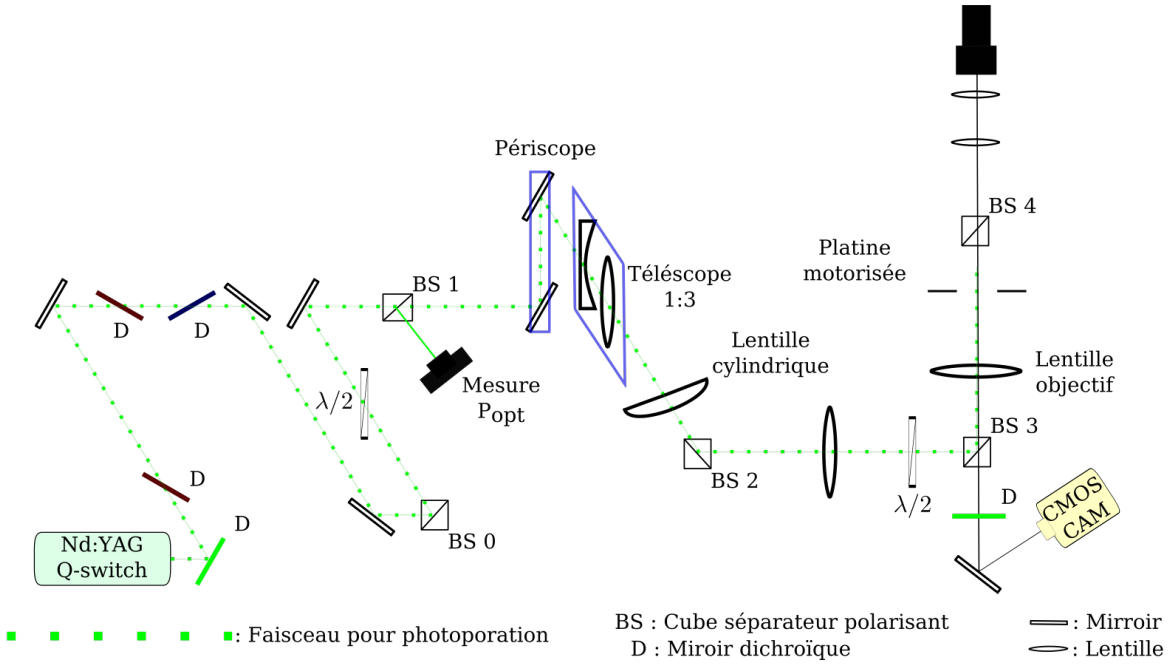


FIGURE 2.6 – **Montage optique pour la photoporation.**
Composition du chemin optique à partir de la source Nd : YAG jusqu'au porte échantillon (sur platine motorisée). Des étapes de filtrages de longueurs d'onde et de polarisation précède la partie qui modifie la géométrie du faisceau (de circulaire à elliptique). Un système d'imagerie est également représenté. Les différents cubes séparateurs polarisants servent également de points de mesure de puissance optique.

La première étape consiste à éliminer les longueurs d'onde résiduelles de la pompe Nd : YAG. Des lames séparatrices sont positionnées pour éliminer le 1064 nm et l'éventuel 355 nm résiduels des étapes de génération d'harmoniques avant le premier cube séparateur. Ces deux longueurs d'onde peuvent contribuer à des phénomènes de claquage laser dans les diélectriques (génération de bulle en cavitation en milieu aqueux) ou d'endommagement de surface comme le silicium ou la silice (*Laser Induced Breakdown*) [128–130]. Le cube séparateur polarisant BS 0 dévie la polarisation du faisceau ayant un énergie très faible ($\leqslant 1\%$ de l'énergie totale) du chemin optique.

L'énergie par impulsion est mesurée par une tête de puissance en réflexion du cube séparateur BS 1. Elle est modifiée en amont par la rotation des cristaux du laser Q-switch pour la génération d'harmoniques à partir de la longueur d'onde 1064 nm, les longueurs d'onde désirées, ici 532 nm, sont ainsi optimisées. Une première lame demi-onde permet de basculer l'énergie en transmission ou en réflexion en aval du cube séparateur BS 1

et d'injecter toute ou partie de l'énergie en sortie du laser Nd : YAG sur l'échantillon ("*platine motorisée*" sur la fig.2.6). Ce degré de liberté permet d'une part, d'effectuer les réglages en toute sécurité, mais aussi de faire varier aisément l'intensité optique d'excitation des nanoparticules pour déterminer le seuil de génération de nano-bulles perméabilisantes.

Le faisceau est élargi par un télescope constitué d'une lentille divergente de focale négative 50 mm et d'une lentille à focale positive 150 mm après élévation du faisceau et rotation de la polarisation avec un périscope. Le faisceau renvoyé à l'infini arrive sur une lentille cylindrique qui le focalise dans une seule direction. La polarisation transmise à travers le cube séparateur BS 1 est tournée et réfléchie sur le cube suivant BS 2. Après une série de collimations à partir de la lentille cylindrique, le faisceau est renvoyé à l'infini, collimaté dans une direction avec une dimension ≈ 1.8 cm (limitée par l'ouverture utile des optiques utilisées). Il est ensuite focalisé dans la direction orthogonale avec une dimension ≈ 140 µm pour répondre au critère $\propto 1$ cm $\times$ 0.01 cm. Pour limiter les effets de la diffraction et éviter l'endommagement par laser, les lentilles utilisées sont des doublets à couche d'air conçus pour les lasers Nd : YAG à la longueur d'onde de 532 nm.

2.3 Photoporation de cellules adhérentes et acquisition des résultats

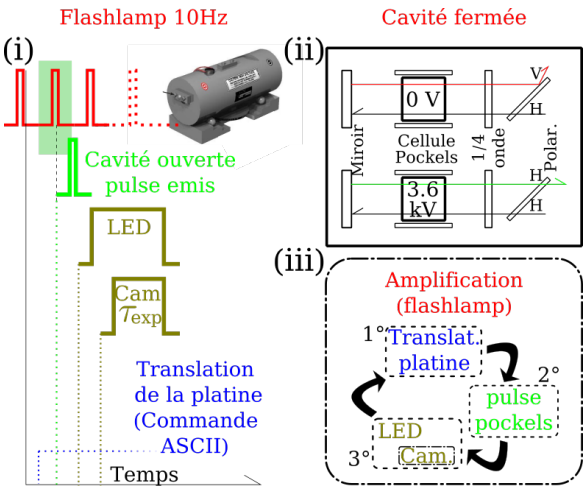
Les cellules en culture préparées selon le protocole établi (fig.2.4) sont irradiées par le faisceau laser obtenu en sortie du montage optique (fig.2.6). Le traitement de la boîte de culture est réalisé par automatisation du laser et de la platine. Après la photoporation, l'évaluation des résultats est obtenue par analyse d'images des échantillons prises avec un microscope à fluorescence.

2.3.1 Photoporation d'un échantillon et automatisation de l'irradiation par laser

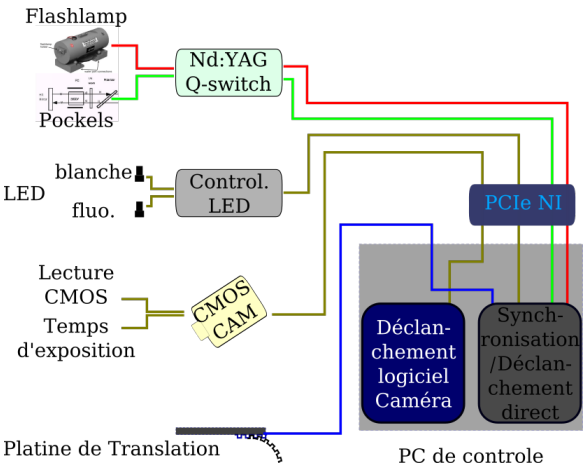
L'échantillon de cellules pré-incubées avec les nanoparticules est placé sur la platine motorisée et la séquence automatisée du traitement est lancée. Grâce à la géométrie elliptique du faisceau, une impulsion laser s'étend sur toute la zone utile de la boîte de culture (fond de verre circulaire). Avec un balayage d'un pas égal à la largeur à mi-hauteur du faisceau, l'intégralité de l'échantillon est traitée à raison d'une impulsion par zone. Après le traitement laser, un délai d'attente de 3 min est nécessaire pour s'assurer que les nanopores, dont la durée de vie est de ≈ 30 s $-$ 1 min, se referment. Deux rinçages avec du DPBS(- - -) sont ensuite effectués pour éliminer le FITC-Dextran de la solution et améliorer le rapport du signal sur bruit lors de l'imagerie de la fluorescence.

Le traitement complet d'une boîte de culture doit se faire en une dizaine de secondes (temps court par rapport au temps de vie des nanopores ~ 3 min). Le balayage de l'échantillon avec le laser au taux de répétition maximal (10 Hz) impose le contrôle de la translation de la platine et sa synchronisation avec l'ouverture de la cavité optique suivant la flashlamp (10 Hz également). L'acquisition d'images est également synchronisée avec la cavité pour la visualisation des zones photoporées avant et après traitement (fig.2.7a).

L'interfaçage du laser Nd : YAG se fait en deux étapes. Un signal TTL en front descendant à une fréquence de 10 Hz déclenche la flashlamp qui excite le milieu amplificateur. La cadence à cette fréquence est nécessaire pour garantir la thermalisation de la cavité et le régime permanent de ses lentilles thermiques. Pour émettre une impulsion, la cavité est ouverte en envoyant un front montant TTL après un délai du front de la flashlamp. Ce délai appelé délai Q-switch, défini le temps d'attente pendant l'inversion de la population d'atomes excités dans le milieu amplificateur après la pulsation de la flashlamp. Plus ce délai est long (de l'ordre de ≈ 100 µs), plus l'énergie de l'impulsion est élevée (plus d'états excités). Un créneaux du même type est alors envoyé à la cellule Pockels (changement de polarisation) pour l'ouverture de la cavité (fig.2.7a).



(a) Organisation de la synchronisation des éléments



(b) Interfaçage avec ordinateur pour la transmission de consigne

FIGURE 2.7 – **Interfaçage et automatisation du traitement par photoporation.**
Fig.a) En utilisant des "waveforms" numériques diagramme *(i)*, les différentes consignes sont implémentées sous forme de chronogramme échantillonné selon un délai minimal (ici entre signal flashlamp et consigne Pockels). Le schéma *(ii)* expose le fonctionnement de la cavité laser à l'émission d'une impulsion. H et V sont les orientations de la polarisation de l'impulsion avec ou sans activation de la cellule Pockels (0 à 3600 V). Le diagramme *(iii)* résume la démarche de l'automatisation : la flashlamp est activée constamment à 10 Hz et une séquence translation-irradiation-acquisition est appliquée. **Fig.b)** Le laser et le contrôleur LED sont asservis avec des signaux TTL par un instrument virtuel. La caméra est placée sous synchronisation externe (à l'aide du logiciel du fabricant) et est déclenchée avec des TTL générés par l'instrument virtuel où une carte d'acquisition (PCIe6323) transmet ces signaux. La platine est reliée avec une connexion série et contrôlée par ASCII.

La communication des signaux (TTL à transition rapide) au laser (cellule de Pockels), à la caméra (acquisition) et au contrôleur de LED (éclairage pour la fluorescence pendant la prise d'images) se fait avec le logiciel de contrôle d'instrument LabVIEW et la carte PCIe6323 Xseries de National Instruments (descriptif fig.E.1a en annexe E). Elle est codée *via* des waveforms numériques. Le délai Q-switch entre le signal de la flashlamp et celui de la cellule Pockels sert pour l'échantillonnage de ces signaux. La flashlamp est activée quant à elle avec la fonction compteur à 10 Hz en arrière plan sans discontinuer. Une synchronisation est faite suivant les fronts de ce compteur pour lancer le traitement de l'échantillon qui commence par l'ouverture de la cavité, l'émission de l'impulsion laser, la prise d'image avec l'éclairage et enfin la translation de la platine à la position suivante à traiter (fig.2.7b).

La zone à traiter de la boîte de culture contenant les cellules est un disque de 1 cm de rayon. Elle est balayée par une translation d'un pas de $d_{\text{pas}} = \text{FWHM}_{532}$ suivant le petit axe du faisceau elliptique (fig.2.5). L'accélération de la platine, sa vitesse et la temporalité de communication sont ajustées pour correspondre aux délais imposés par le compteur (flashlamp) afin d'éviter les retards entre les différentes étapes.

2.3.2 Imagerie en fluorescence post-photoporation

Des images sont prises régulièrement avant et après le traitement laser pour évaluer l'effet du traitement de la photoporation sur la viabilité et sur la dynamique de croissances des cellules avec un microscope inversé en fluorescence et contraste de phase. La partie fluorescence est adaptée aux longueurs d'ondes d'excitation et d'émission des fluorophores utilisés. Un objectif Nikon PlanFluor 4X est utilisé pour une évaluation rapide du

nombre de cellules et de leur fluorescence. Avec son champ de 3.3×3.3 mm^2, la zone d'intérêt est acquise en quelques images (9 positions ≈ 0.9 cm^2) en quelques minutes (≈ 5 min). Pour s'assurer que chaque position soit mise au point pendant la prise d'image, un balayage vertical enregistre des images par incrément de 50 µm de hauteur d'objectif. Une étape de détection de mis-au-point (focus) en post-traitement isole l'image mise au point pour chaque position (voir fig.C.1 et B.1a en annexe B).

Avec son champ réduit (0.67×0.67 mm^2) et sa focalisation de la lumière d'excitation, l'objectif Nikon S-Plan Fluor 20x avec une ouverture numérique de 0.7 permet de meilleures résolutions spatiales et de niveaux de gris. Il est utilisé pour quantifier la fluorescence des cellules traitées dans du tampon phosphate salin avec calcium et magnésium (DPBS(+ + -)). Pour simplifier l'étape de détection lors de l'analyse, les cellules à imager sont marquées avec un intercalant de l'ADN. Ce marquage Hoechst nucléaire préalable est fait 24 h après le traitement par photoporation et facilite la détection des noyaux par fluorescence. 289 positions (≈ 1.2 cm^2) sont balayées, mises au point en temps réel avec le système d'autofocus du microscope, pour couvrir la majeur partie de l'échantillon (voir fig.B.1b en annexe B).

2.3.3 Détection d'objet par segmentation d'image

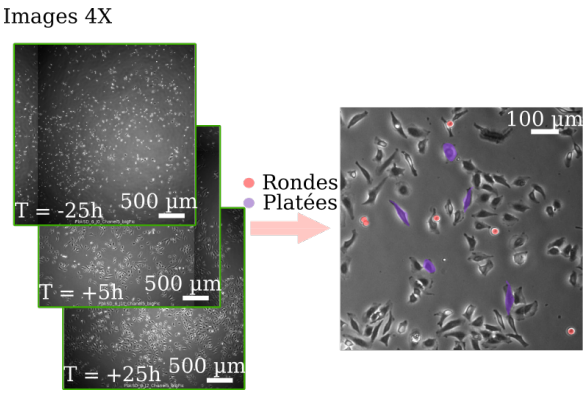
La quantification de la performance de photoporation est réalisée en estimant la quantité de macromolécules exogènes incorporées par la cellule suite au traitement. On mesure l'intensité de la fluorescence émise par la molécule à l'intérieur du cytoplasme de la cellule. La démarche consiste à détecter et localiser les cellules (ou leur noyau) et d'aller sonder la fluorescence émise par le FITC-dextran, la molécule incorporée. La population de cellules photoporées est décrite par une distribution des valeurs d'intensité de fluorescence moyennée sur la région d'intérêt *i.e.* la cellule ou son noyau (description de la démarche en annexe C).

Les objets à détecter, en lumière blanche ou en fluorescence, se distinguent de l'arrière plan de l'image par leur niveau de gris, proportionnel à l'intensité de lumière émise ou transmise (fig.2.8c). L'histogramme de l'image (niveaux de gris) est égalisé avant d'effectuer un seuillage pour la segmentation d'image. Cette technique courante en analyse d'images vise à répartir les pixels de façon à obtenir une densité de fonction cumulée linéaire pour améliorer le contraste [131]. Cependant, pour des images avec une variabilité d'intensité selon les régions, cette méthode est appliquée localement sur des sous-matrices de l'image. Enfin, pour éviter d'amplifier le bruit dans les zones où l'intensité est uniforme, l'égalisation se fait après réorganisation des zones de l'histogramme montrant une forte concentration de valeurs (*Contrast Limited Adaptive Histogram Equalization – CLAHE*) [132].

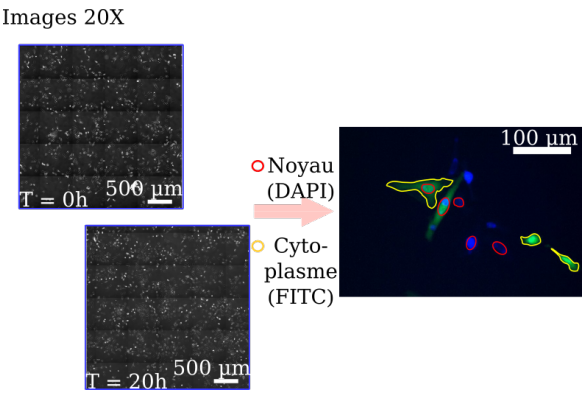
En appliquant un filtre de type Wiener, l'image est alors lissée. Avec le seuillage, les valeurs des pixels vont être changées en 1 et 0 selon si elles sont supérieures ou inférieures au seuil fixé. En comparant les pixels voisins, certaines valeurs sont corrigées pour former les régions d'intérêt compactes qui sont ensuite caractérisées par leurs propriétés géométriques (surface, périmètre circularité) ce qui permet de restreindre ces critères et d'isoler celles qui représentent les objets recherchés, ici des cellules ou leur noyaux (fig. 2.8a et 2.8b).

2.3.4 Mesure de la fluorescence et de la viabilité lors de la photoporation

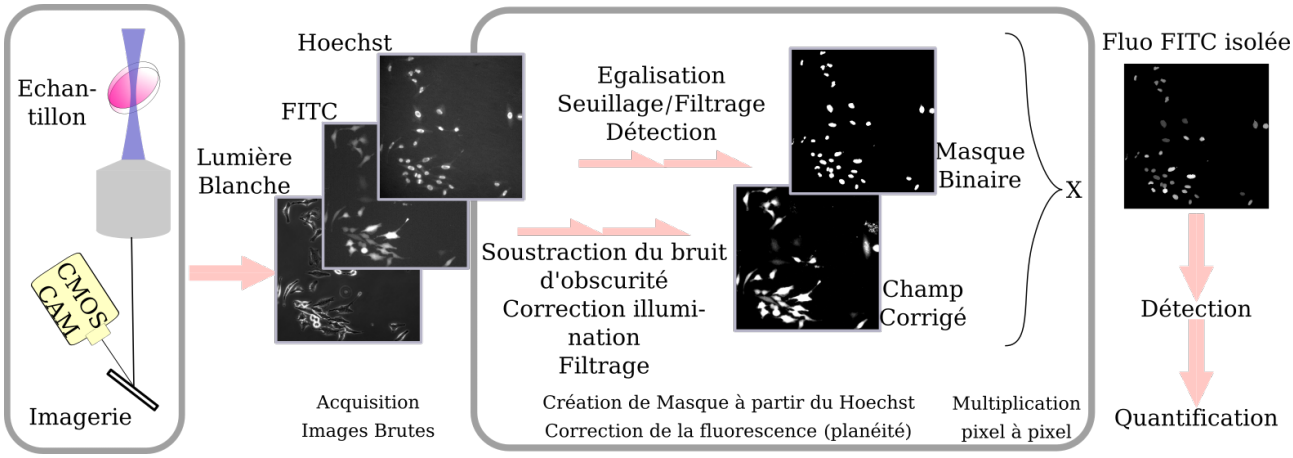
Des masques binaires, obtenus à partir des régions isolées par l'étape de segmentation, sont appliqués (multiplication pixel à pixel) aux images des canaux de fluorescence (images brutes) après les corrections du champ d'illumination. La première correction enlève le signal de bruit d'obscurité de la caméra (soustraction d'une matrice dont les valeurs sont les retours des pixels sans éclairage). La deuxième rectifie la non-uniformité du



(a) Segmentation en lumière blanche des images 4X



(b) Segmentation sur le canal Hoechst des images 20X



(c) Synoptique de l'acquisition et traitement des résultats

FIGURE 2.8 – **Imagerie cellulaire de photoporation et de suivi de croissance cellulaire.**
Fig.a) Les images enregistrées à l'aide d'un objectif 4x sont en contraste de phase. Les cellules adhérentes et rondes sont respectivement plus sombres et plus brillantes que l'arrière plan. Elles sont détectées pour suivre le nombre de cellules adhérentes et le nombre de cellules rondes (potentiellement mortes) dans le temps. Le nombre de cellules est ramené à une densité surfacique. **Fig.b)** Les images au 20x sont prises en lumière blanche avec contraste de phase et en fluorescence pour le marquage des noyaux au Hoechst. Les noyaux sont détectés sur des critères morphologiques (taille, circularité...). Les masques ainsi obtenus servent à quantifier la fluorescence de chaque noyau et à établir la densité cellulaire de référence pour normaliser l'évolution de la population. Une 1e série d'images à ce grandissement est prise comme origine des temps. **Fig.c)** Les cellules photoporées sont imagées sur microscope à fluorescence couplé à une caméra. La segmentation d'images consiste à détecter les objets d'intérêt (noyaux cellulaires marqués au Hoechst) afin de créer des "masques" à partir des images brutes (après seuillage, filtrage...). Ces masques sont reportés sur les images brutes des canaux d'intérêt pour délimiter uniquement les cellules. Les canaux d'intérêt sont traités pour corriger la planéité du champ et soustraire la valeur d'obscurité de l'intensité mesurée par la caméra. Après application des masques, les objets d'intérêt sont détectés et caractérisés. Les sorties du script de segmentation sont envoyées à un script de quantification où les populations de cellules sont décrites par leur nombre et leur fluorescence intracellulaire (exemple avec des images au 20x).

champ d'excitation par la LED utilisée pour l'excitation des fluorophores (plus d'énergie au centre de l'image qu'en périphérie). En cartographiant le champ d'excitation par un fluorophore, les images sont alors renormalisées pixel à pixel avec ce dernier pour corriger l'image de fluorescence. Les images issues de ce pré-traitement sont utilisées avec les masques du précédent pour délimiter la zone occupée par l'objet détecté (fig. 2.8c).

Les objets sont enfin dénombrés (en lumière blanche et en fluorescence Hoechst) et caractérisés (pour la fluorescence) par des mesures de moyenne d'intensité et d'écart type sur la zone traitée. Le suivi du nombre de cellules donne accès à la courbe d'évolution de la croissance cellulaire. Les mesures de fluorescences sont exploitées pour décrire la performance du traitement par photoporation dans l'incorporation de la molécule exogène.

Le protocole de photoporation s'étend sur $\sim$ 96 h avec un suivi effectif à partir de l'irradiation. Comme le processus de photoporation (perméabilisation et incorporation) ne dure que quelques minutes, les images sont prises à $\pm$1 h. Les points de référence sont l'irradiation par le laser Q-switch à $J0$, noté t_0, et l'imagerie avec le 20X après $\sim$ 24 h à $J+1$ (fig.2.9) qui est pris comme temps de référence $t_{\text{réf.}}$. Ce délai correspond à peu près au délai de doublement de cellules HeLa en culture dans des conditions normales. Après l'étape d'analyse d'image, les informations recueillies tout au long de cette durée servent à décrire les performances de photoporation. La mesure de la fluorescence à $t_{\text{réf.}}$ sert pour la caractérisation de la perméabilisation des cellules par photoporation pour discriminer entre les différents mécanismes d'incorporation du FITC-Dextran par la cellule. Le suivi du nombre de cellules de t_0^- à $J0$ jusque $J+2$ abouti à une description de l'effet de l'irradiation sur la viabilité des celles (nombre de cellules mortes après l'irradiation) et sur le métabolisme (courbe de croissance des cellules). Cette méthodologie caractérise dans le suite les différents paramètres dont dépend la qualité de perméabilisation par photoporation.

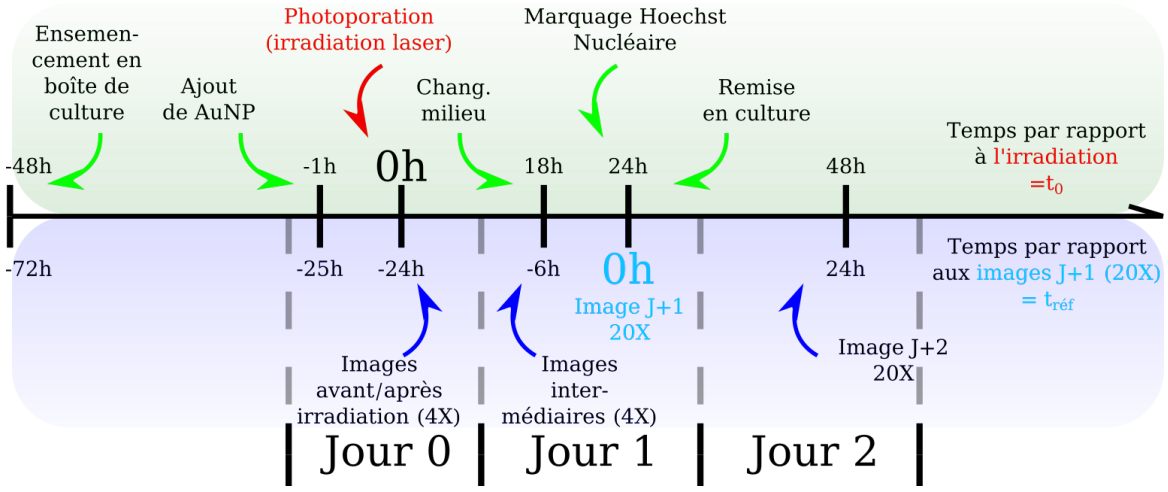


FIGURE 2.9 – **Synthèse du protocole de photoporation de cellules adhérentes.**
Récapitulatif du déroulement dans le temps de la photoporation d'un échantillon de cellules adhérentes. Les points autour de l'instant $t = 0$ h par rapport à l'imagerie de référence sont approximatifs. L'axe est gradué en heure selon deux références. Les graduations du haut prennent l'instant de l'irradiation comme instant initial (t_0). Les graduations du bas prennent l'instant de l'imagerie avec l'objectif 20X comme instant initial ($t_{\text{réf}}$) pour le suivi de croissance et mesure de la fluorescence. La préparation des boîtes de culture se fait deux jours avant irradiation. La photoporation est réalisée le jour 0 (J0) après incubation avec les nanoparticules d'or (0 h par rapport à l'irradiation, -24 h par rapport aux images de référence 20X). Des images sont prises avant et après le traitement pour estimer le nombre de cellules mortes. À $J+1$, les images de références sont prises après changement de milieu (+24 h par rapport à l'irradiation, 0 h par rapport aux images de référence 20X). Les courbes de croissances cellulaires sont complétées par des prises d'images intermédiaires avec le 4X à partir de $J0$. Un relevé de population est également effectué à $J+2$ soit à peu près 48 h après la photoporation.

3 Résultats et Discussion : photoporation et variabilité

La photoporation est caractérisée par le taux de viabilité, décrit avec des grandeurs de croissance et de survie pour évaluer l'impact du traitement sur le métabolisme des cellules. Elle est bien entendu caractérisée par la fraction positive obtenue, soit le rapport entre le nombre de cellules ayant été perméabilisées et le nombre total de cellules dans l'échantillon, indicateur de la performance du traitement. Cependant, la photoporation est également caractérisée par l'efficacité d'incorporation soit par la quantité intracellulaire d'exomolécules mesurée avec la fluorescence intracellulaire, qui varie selon les mécanismes de transfert à travers la membrane cellulaire.

Ces paramètres sont extraits à partir des données brutes obtenues par imagerie et distinguent les différents mécanismes d'incorporation dans le cytoplasme. Ils sont comparés dans le cas de trois types d'échantillon. Les cellules irradiées par le laser Q-switch en présence de nanoparticules adsorbées sont les échantillons photoporés. En parallèle, des cellules sont irradiées sans pré-incubation avec des nanoparticules. Cet échantillon, le contrôle laser, représente la contribution de la photoporation directe. Enfin, des échantillons témoins non-irradiés et sans nanoparticules sont suivis pour évaluer et décrire la contribution de l'endocytose (contrôle passif) mais aussi pour mesurer la viabilité hors traitement (témoins de croissance).

Des cellules sont donc photoporées dans différentes conditions (irradiation, concentration de nanoparticules, fluence) pour caractériser l'incorporation avec ou sans création de nanopores et déterminer si cette création est faite par effet photothermique ou par génération de nano-bulles de vapeur.

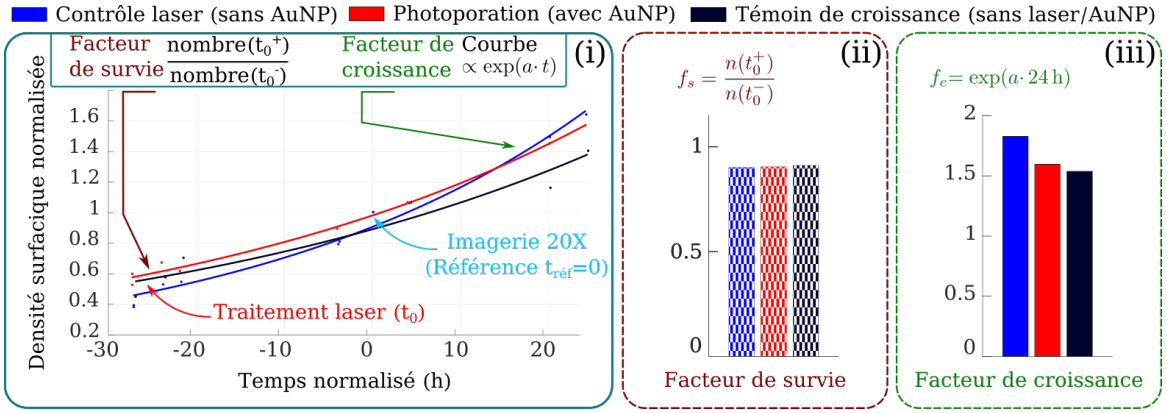
3.1 Perméabilisation et incorporation de macromolécules par photoporation

Des cellules HeLa sont photoporées après pré-incubation avec une suspension de nanoparticules pour obtenir ~ 8 part./cell.. Elles sont irradiées par des impulsions de 5 ns d'un laser elliptique Q-switch de fluence maximum $I_{\max} \approx 2.6$ J/cm^2. Le FITC-Dextran 10 kDa en solution dans du milieu de culture a une concentration de 2 mg/ml. Cet essai de photoporation sert de test du banc optique et du protocole mis en place. Les mesures effectuées sont comparées aux essais de contrôles pour l'évaluation des résultats : le témoin de croissance pour mesurer la viabilité, le contrôle laser pour évaluer la différence de perméabilisation avec la photoporation directe (sans nanoparticules) et enfin le contrôle passif pour comparé l'efficacité d'incorporation entre la création de nanopores et l'intégration passive (sans irradiation) du FITC-Dextran 10 kDa par endocytose.

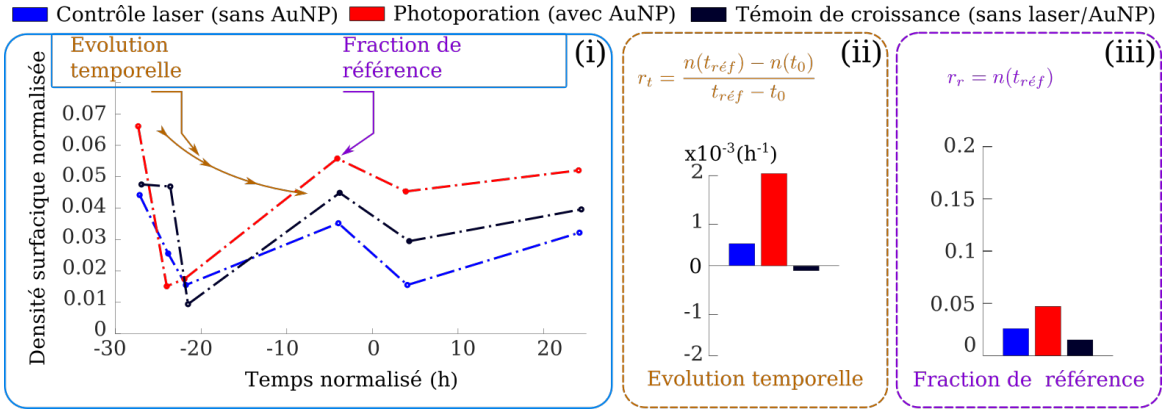
3.1.1 Viabilité des cellules après photoporation directe et par nanoparticules

Dans tout protocole de transfection, les cellules biologiques sont soumises à différents types de stress pouvant entraîner la mort cellulaire. Pour évaluer une approche de transfection, en plus de la fraction de cellules positives ayant incorporé la macromolécule d'intérêt, il faut aussi établir la viabilité du protocole et mesurer la létalité envers les cellules. L'échantillon témoin de croissance, préparé pour chaque série de photoporation, subit les même étapes de préparation d'échantillon sans nanoparticules ni irradiation par laser. Sa croissance est alors suivie comme référence pour limiter la variabilité due au nombre de passages sur le temps de doublement de la population de cellules (~ 22 h).

La courbe de croissance est construite à partir des images prises avant et après photoporation (courbes ***(i)*** de la fig.2.10). Le nombre de cellules comptées est converti en densité cellulaire par unité de surface (cell./cm^2). Il est ensuite comparé au nombre obtenu 24 h après le traitement avec l'objectif 20x car les images recouvrent une plus grande surface. Cet instant est pris comme temps de référence $t_{\text{ref}} = 0$ h. Par conséquent, le traitement



(a) Facteurs de survie f_s et de croissance f_c des courbes de suivis de population



(b) Suivi du nombre de cellules rondes avec l'évolution temporelle r_t et la fraction de référence r_r

FIGURE 2.10 – **Évaluation de la viabilité des cellules photoporées.**
La viabilité est décrite par quatre grandeurs instantanées (facteur à l'instant t_0 ou $t_{réf}$) et temporelles (évolution de densité). Elles sont obtenues à partir du comptage de cellule sur une durée de $\approx 30-40$ h qui est ramené à une densité surfacique normée par le nombre de cellules par unité de surface à $t_{réf} = 0$ h (obtenu avec le 20x). **Fig. a)** Les échantillons sont comptés pour reconstruire la courbe de croissance (courbe ***(i)***). Pour s'affranchir de la variation de la dynamique selon le passage pour chaque jeu d'expérience, un échantillon témoin de croissance est analysé. Le nombre de cellules adhérentes renvoie autour de t_0 (traitement) la fraction de la population perdue (facteur de survie f_s diagramme ***(ii)***). La croissance des cellules suit une courbe exponentielle dont est extrait f_c le facteur de croissance (diagramme ***(iii)***). **Fig. b)** Suivant leurs morphologies, les cellules rondes sont potentiellement en mort cellulaire. Le relevé de cette population doit montrer une portion à la baisse et négligeable ($\leqslant 5\%$) si le traitement n'a pas été létal. La population normalisée affichée est le nombre de cellules par unité de surface à chaque série d'image divisé par le nombre de cellules par unité de surface obtenu lors du comptage des images $t_{réf} = 0$ h (courbes ***(i)***). Le différentiel des densités obtenues à t_0^+ (post-traitement) et à $t_{réf}$ par rapport au temps donne l'évolution temporelle r_t (diagramme ***(i)***). Ce facteur est complété par r_r la fraction de référence à $t_{réf}$ (diagramme ***(i)***). Les irradiations laser et les effets plasmoniques n'ont pas d'impact sur la dynamique de croissance

et les premières images sont réalisés à $t_0 \sim -24$ h (extrait du script en annexe C).

Le rapport des densités cellulaires à t_0^+ et t_0^-, respectivement avant et après la photoporation, définit la fraction de cellule éliminées pendant les manipulations et les expériences de photoporation notée. Il est noté f_s (diagramme ***(ii)*** fig.2.10a). Les trois échantillons étudiés (photoporé, contrôle laser et témoin de croissance) ont respectivement ~ 90, ~ 90 et $\sim 91 \pm 3\%$ de cellules viables après le traitement. Les $\sim 10\%$ de perte correspondent au basal de la mort cellulaire et aux incertitudes de détection pendant le comptage. On peut donc

conclure qu'il n'y a pas de mort cellulaire induite pendant la photoporation que cela soit *via* l'irradiation des impulsions ou la présence des nanoparticules et leur excitation.

Les densités de cellules avant traitement suivent une tendance exponentielle avec un temps de doublement d'environ 24 h. L'approximation de la courbe par une fonction $\propto \exp(a\,t)$ avec $a \in \mathrm{IR}$ permet l'extrapolation à $t_{\text{réf}} + 24$ h de l'évolution de la densité de cellules. Le facteur de croissance f_c correspond au facteur de multiplication de la population attendu après le temps de doublement des cellules HeLa (~ 24 h). Les trois conditions (photoporé, contrôle et témoin) ont des valeurs similaires respectivement $\sim 1.6, 1.8$ et 1.5 ± 0.1 (diagramme ***(iii)*** fig.2.10a). Les légères différences enregistrées résultent des incertitudes pendant la détection d'objet et de l'approximation par la courbe exponentielle d'ajustement. Ainsi, avec une valeur de multiplication comparable à celle du témoin de croissance, la photoporation ne ralentit pas le métabolisme des cellules irradiées. Cependant, ces facteurs inférieurs à 2 estimés à 24 h indiquent que la croissance peut varier selon le support ou l'étape de culture ou encore la densité. Afin de s'affranchir de ces variabilités, ces résultats sont comparés à un témoin de croissance.

Les cellules HeLa, adhérentes en culture, deviennent rondes (rond brillant dans les images en lumière blanche au 4x) lors des phases de divisions ou de mort cellulaire. Le nombre de cellules rondes détectées est quantifié par sa densité surfacique qui est comparée au nombre de cellules de référence obtenu à $t_{\text{réf}}$ (courbes ***(i)*** fig.2.10b). Ces densités fluctuent à cause des rinçages ou du décollement des cellules rondes mortes. Le différentiel entre le nombre de cellules rondes à t_0^+ (post-traitement) et le nombre à $t \sim t_{\text{réf}}$ est noté r_t pour décrire l'évolution temporelle globale des cellules rondes (diagramme ***(ii)*** fig.2.10b). La fraction de référence r_r est introduite pour déterminer la densité de cellule rondes à $t_{\text{réf}}$ pendant la quantification de la fluorescence (diagramme ***(iii)*** fig.2.10b). Dans le cas présent, la pente de l'évolution temporelle r_t est très faible $\sim \pm 10^{-3}$/h et la fraction à $t_{\text{réf}}$ est $r_r \leqslant 5\%$. La fraction de la population ronde reste relativement constante à cette valeur. Il n'y a donc pas de mortalité accrue des cellules traitées par rapport au contrôle.

La description globale de l'échantillon traité par photoporation, par rapport aux différents contrôles, donne des informations sur deux aspects. La mort cellulaire décrite par les grandeurs de viabilité instantanées f_s et r_r (cellules manquante ou ronde) est comparable à celle de l'échantillon témoin pour les échantillons traités par laser avec et sans nanoparticules adsorbées. La reprise de croissance est cohérente avec le témoin de croissance (sans laser ni nanoparticules) et le nombre de cellules morphologiquement anormales est faible (Les grandeurs temporelles f_c et r_t fig.2.10). La photoporation ne nuit donc pas aux cellules HeLa dans les conditions étudiées.

3.1.2 Fraction positive globale avec des nanoparticules

La fraction positive globale est le rapport entre le nombre de cellules positives (ayant incorporé l'agent exogène) et le nombre de cellules total dans tout l'échantillon photoporé. Toute la population est classée selon un niveau d'intensité de fluorescence moyennée sur la zone de pixels occupée par le noyau détecté pendant l'analyse. Pour une intensité moyenne donnée, la densité de fonction cumulée (CDF) correspondante représente la fraction de la population avec une intensité de fluorescence inférieure à cette valeur (courbe ***(i)*** de la fig.2.11).

Le seuil à appliquer se situe au voisinage de la valeur nulle. La catégorie à intensité nulle sont les cellules qui n'expriment pas de fluorescence. Pour prendre en compte les incertitudes de mesure de la caméra, le seuil est placé à $2{*}\sigma_{\text{cam}}$ où $\sigma_{\text{cam}} \approx 1.5$ u.a. est l'écart type des pixels d'un champ en obscurité. Ce même écart-type va définir l'erreur sur les niveaux de gris autour du seuil (barre horizontale sur la courbe ***(ii)*** fig.2.11). Les valeurs

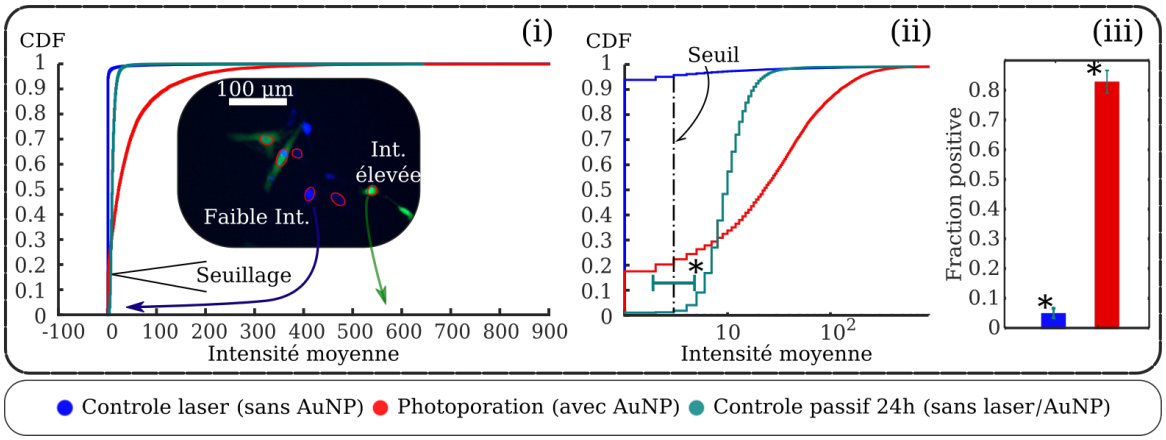


FIGURE 2.11 – **Quantification de la fraction positive**
La quantification de la fluorescence 24 h après traitement (fig. 2.8b) renvoie une distribution d'événements (noyaux détectés dans tout l'échantillon) en fonction des niveaux de fluorescence exprimés (courbes ***i***). La représentation en densité de fonction cumulée représente, pour un seuil donné, la fraction positive de la population de cellules photoporées (diagramme ***(iii)***). Le seuil est défini par rapport à l'écart type du bruit d'obscurité enregistré par les pixels de la caméra (≈ 1.5) ajouté à la valeur minimum (barre horizontale $*$ sur les courbes ***(ii)*** montrant les mêmes distributions en échelle logarithmique). Ce même écart-type définit l'incertitude sur la fraction positive de la population (barre d'incertitude $*$ sur ***(iii)***). Pour les deux conditions avec traitement laser, les fractions positives sont $80 \pm 5\%$ et $4 \pm 1\%$ pour respectivement avec ~ 8 part./cell. (photoporation avec AuNP) et sans nanoparticules (contrôle laser sans AuNP).

correspondantes en densité de fonction cumulée (CDF) sont soustraites à l'unité et transposées pour obtenir la fraction de population positive, *i.e.* le taux de transfection, et son erreur sur le diagramme ***(iii)*** fig.2.11.

Trois traitements différents sont étudiés. L'échantillon "contrôle laser (sans AuNP)" est traité par laser sans ajout de nanoparticules selon la méthode exposée plus haut. Dans cette condition, on obtient une fraction positive de $4 \pm 1\%$ en photoporation directe (diagramme ***(iii)*** fig.2.11). En irradiant le milieu avec une impulsion à $I_{\max} \approx 2.6$ J/cm^2, il se produit localement la création de pores dans la membrane cellulaire par des effet thermiques (dénaturation locale de la membrane), chimiques (création d'espèces d'oxygène réactives) ou mécanique (création de bulle de cavitation). Pour rendre cette création plus systématique, l'apport d'énergie doit se faire sur des temps beaucoup plus courts ($\sim$ fs) [56].

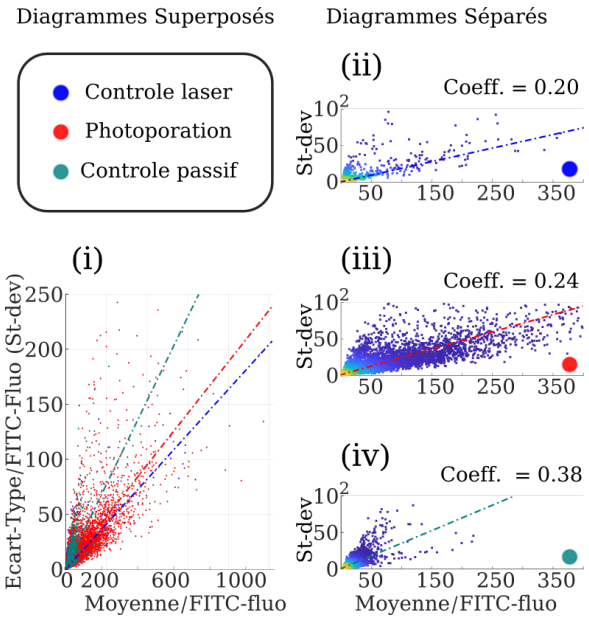
L'échantillon "Photoporation (avec AuNP)" est traité par laser après pré-incubation des cellules avec une suspension de nanoparticules pour obtenir ~ 8 part./cell.. La présence des intermédiaires plasmoniques convertit et localise l'énergie optique de l'impulsion laser. Des nanopores sont générés beaucoup plus systématiquement même au régime ns des impulsions utilisées et la fraction positive atteint $80 \pm 5\%$. Cette valeur, moyennée sur tout l'échantillon, indique que ces conditions permettent la génération de nano-bulles (mécanismes de photoporation fig.2.1) puisque la fraction est supérieure à 50% [71, 74].

L'échantillon "Contrôle passif 24 h(sans laser/AuNP)" est obtenu en laissant les cellules 24 h dans une solution de FITC-Dextran 10 kDa à 2 mg/ml. La distribution de la fluorescence (courbe ***(ii)*** fig.2.11) est décalée indiquant que toutes les cellules de l'échantillon expriment de la fluorescence. L'image prise fig.2.2a confirme effectivement un taux de marquage élevé mais une fluorescence plus faible et hétérogène représentée par une distribution étroite sur les graphiques de CDF.

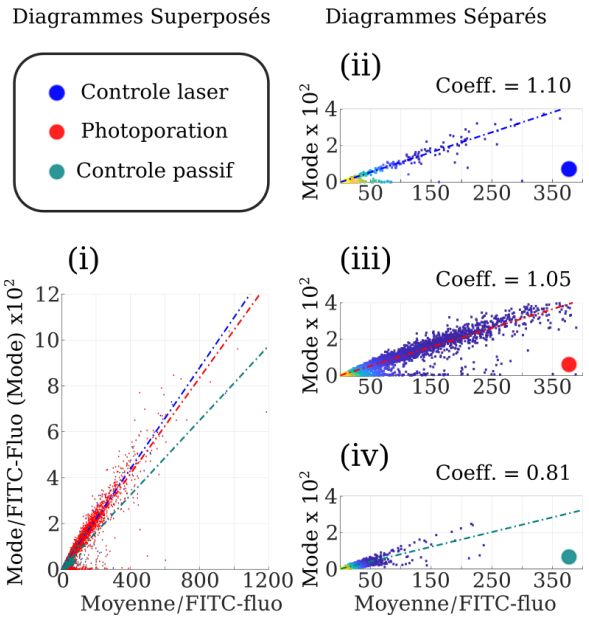
L'ajout de nanoparticules augmente l'efficacité de la photoporation de 5 à $80 \pm 5\%$ de fraction positive. La

fraction positive globale obtenue avec la fluence optique utilisée ($I_{\max} \sim 2.6$ J/cm^2) est cohérent avec la littérature dans le cas de photoporation par génération de nano-bulles de vapeur (fig.2.11) [71]. Ce critère est nécessaire et non suffisant puisque la distribution décalée mais étroite du contrôle passif 24 h renvoie une fraction positive de 100%. La description de la fluorescence intracellulaire à l'échelle de la cellule unique permet de discriminer entre l'incorporation du FITC-Dextran par création de nanopores et endocytose.

3.1.3 Photoporation à l'échelle de la cellule unique : description de la fluorescence intracellulaire



(a) Diagrammes de dispersion de l'écart-type σ en fonction de la moyenne μ de la fluorescence FITC



(b) Diagrammes de dispersion du mode en fonction de la moyenne de la fluorescence FITC

FIGURE 2.12 – **Photoporation à l'échelle de la cellule unique**
La fluorescence intracellulaire FITC individuelle des cellules perméabilisées est quantifiée. La surface recouverte par le noyau (objet détecté pendant la segmentation) est évaluée par des grandeurs statistiques de la fluorescence : l'écart-type et le mode (valeur la plus fréquente dans la zone du noyau). Les graphiques ***i*** des deux figures représentent les diagrammes superposés des échantillons. Le code couleur des graphiques ***(ii,iii,iv)*** séparés est indicatif de la densité de point par région. **Fig. a)** L'écart-type individuel décrit la dispersion du niveau de fluorescence au sein d'une cellule individuelle. Sur le diagramme de dispersion (graphique ***(i)*** figurent en fonction de la moyenne la distribution de la fluorescence et la tendance des nuages de point. Les graphiques ***(ii,iii,iv)*** représentent les diagrammes séparés avec les coefficients directeurs des courbes de tendance obtenus par régression linéaire. Les échantillons photoporé et contrôle laser ont des valeurs comparables. La dispersion du contrôle passif est plus importante (coefficient $\sim 2\times$ plus grand) dans sa gamme d'intensité. **Fig. b)** Le mode est la valeur d'intensité la plus fréquente sur la surface du noyau. Dans le cas d'une fluorescence uniforme, le mode doit être proche de la moyenne. Le contrôle passif est caractérisé par des foyers de fluorescence par cellules puisque le mode évolue avec une pente $\leqslant 1$ avec la moyenne ***(ii,iii,iv)***.

La fraction positive est donc une mesure binaire de la performance de photoporation. L'expression de la fluorescence détermine l'incorporation et par conséquent la perméabilisation des membranes cellulaires. Or, cette même mesure appliquée à l'échantillon de contrôle passif aboutit à 100% de cellules marquées au delà du seuil choisi (courbe ***(ii)*** fig.2.11). L'endocytose réalisée en laissant les cellules dans du milieu contenant du FITC-Dextran se produit pour toute la population mais l'efficacité d'incorporation est limitée car la distribution des intensités est très étroite à l'échelle de l'échantillon et hétérogène à l'échelle de la cellule (fig.2.11 et 2.2).

La description de la fluorescence intracellulaire (à l'échelle de la cellule unique) quantifie la qualité d'incorporation de FITC-Dextran et permet de distinguer entre l'incorporation *via* la création de nanopores et l'in-

corporation passive par endocytose. Les noyaux des cellules détectés pendant l'étape de segmentation sont considérés comme des régions d'intérêt recouvrant une surface en pixel ($\sim 200 - 2000$ pixels par noyau). La fraction positive globale est déduite de la moyenne de l'intensité sur tous ces pixels notée μ qui dépend de la quantité de FITC-Dextran incorporée par la cellule. L'écart par rapport à la moyenne est estimé par l'écart-type σ et dépend de l'uniformité de la fluorescence dans le cytoplasme.

$$\mu = \frac{\sum_i^n x_i}{n} \quad \text{et} \quad \sigma = \sqrt{\frac{\sum_i^n (x_i - \mu)^2}{n-1}}$$

où n le nombre de pixel et x_i l'intensité mesurée par pixel (niveau de gris)

Les paramètres μ et σ sont représentés dans un diagramme de dispersion pour les trois échantillons : photoporé, le contrôle passif et le contrôle laser (diagramme ***(i)*** fig.2.12a). L'allure des nuages de points par rapport à la moyenne décrit les distributions en CDF (fig.2.11) où seul l'échantillon photoporé contient les hautes intensités. La corrélation entre écart-type et moyenne des fluorescences intracellulaire indique des différences d'évolution (coefficients de pentes) entre les trois échantillons d'intérêt. Les graphiques ***(ii)***, ***(iii)*** et ***(iv)*** sont les mêmes diagrammes de dispersion séparés avec le coefficient directeur de la courbe de tendance. Le code couleur indique à titre qualitatif la densité de points par intervalle $\mu * \sigma$. Les valeurs des pentes, 0.20 et 0.24, pour la photoporation (respectivement avec et sans nanoparticules) sont inférieures d'un facteur ≈ 2 à la tendance de l'échantillon passif (0.38). La dispersion de la fluorescence intracellulaire est plus importante pour l'endocytose que pour l'incorporation après création de nanopores, pour des moyennes équivalentes. Elle traduit la diffusion limitée du FITC-Dextran à l'intérieur du cytoplasme.

Sur l'histogramme d'intensité de fluorescence du noyau, le mode se définit comme la valeur d'intensité pour la laquelle la fonction densité de probabilité (PDF) passe par un maximum (valeur la plus fréquente). Si la fluorescence est uniforme, le mode s'approche de la valeur moyenne et la corrélation entre les deux grandeurs doit avoir un coefficient de pente proche de l'unité (diagramme ***(i)*** fig.2.12b). Dans ce cas, les molécules de FITC-Dextran ont bien intégré la cellule à travers le cytoplasme et occupent tout le volume autour du noyau. Pour une fluorescence hétérogène (localisée ou lacunaire) dans la zone d'intérêt (noyau de la cellule), le mode évolue différemment (pente < 1 ou > 1) avec la moyenne de la fluorescence intracellulaire.

L'incorporation du FITC-Dextran 10 kDa sans la création de pores est effectuée par la formation de vésicules qui concentrent des molécules fluorescentes au voisinage de la surface du cytoplasme sans diffusion interne [125]. La contribution à la fluorescence au niveau du noyau ne se fait qu'à travers des foyers d'intensité, localisés et peu étendus (voir image fig.2.2a). Ainsi pour les pixels du noyaux, la moyenne de ceux fluorescents, occupés par les vésicules, est diminuée par les non-fluorescents. Pour l'échantillon contrôle passif, la corrélation entre mode et fluorescence suit une droite de pente 0.81 indiquant que la valeur la plus fréquente enregistrée par les pixels dans un noyau de cellule est inférieure à la moyenne (diagramme ***(iv)*** fig.2.12b). Pour les échantillons traités par laser en revanche, le mode évolue avec la moyenne avec des coefficients directeurs 1.10 et 1.05 proches de l'unité (graphique ***(ii,iii)*** fig.2.12b). La création de nanopores implique donc à une uniformité de la fluorescence contrairement à l'endocytose qui est mesurable en comparant mode et moyenne.

Contrairement à l'endocytose, la perméabilisation des membranes cellulaires résulte en une uniformité de la fluorescence intracellulaire, décrite quantitativement par la représentation de l'écart-type et du mode par rapport à

la valeur moyenne : la création de nanopores (avec ou sans nanoparticules) permet une meilleure incorporation. Par ailleurs, la perméabilisation est possible suivant deux mécanismes photo-thermique ou photo-acoustique et leur contribution est déterminée par la fluence de l'irradiation. Avec une taille de faisceau ($\sim$ 1 cm $\times$ 0.1mm) comparable à l'échantillon, ses différentes zones sont irradiées avec une fluence $\geqslant I_{\max}/2$ ou $\leqslant I_{\max}/2$ à cause de la distribution d'énergie gaussienne du faisceau (profil d'émission Rhodamine B fig.2.5a).

Afin de dégager une corrélation entre position par rapport au maximum de fluence et la fraction positive locale mesuré par zone, nous allons étudié spatialement la distribution des cellules photoporées. Avec la diminution de la fluence le long de l'axe du faisceau elliptique, la fraction positive locale doit diminuer puisque la contribution à la création de nanopores de l'effet photo-thermique augmente. La correspondance entre fraction positive et fluence locales définira le seuil de photoporation par génération de nano-bulles de vapeur.

3.1.4 Quantification du seuil de photoporation par nano-bulles de vapeur : méthode

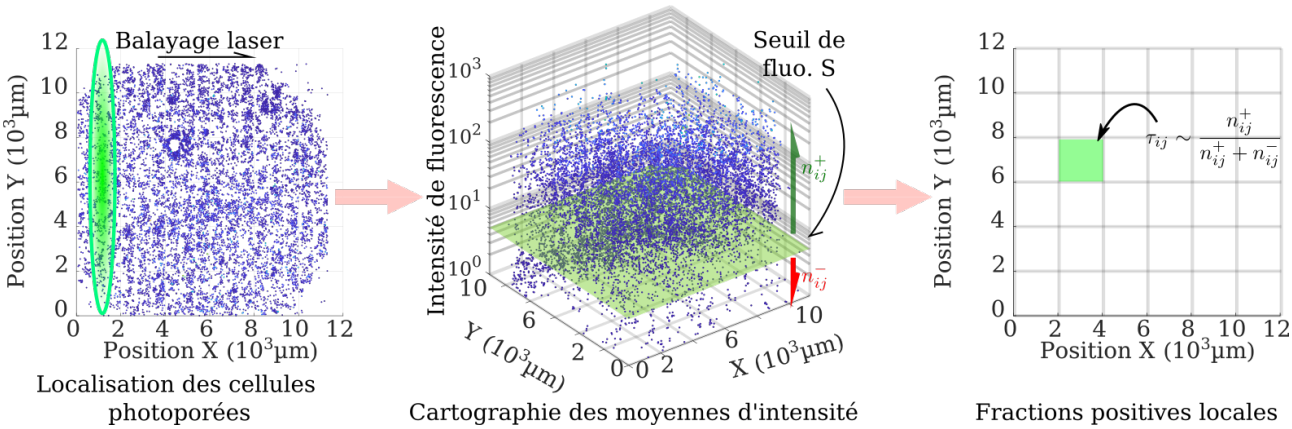
Le traitement laser (142 positions) et l'imagerie à $t_{\text{réf}}$ (17×17 positions au 20X) sont réalisés par des motifs définis (respectivement rectiligne et en spiral, fig.C.1 en annexe C). La reconstitution de l'image globale permet d'orienter l'échantillon par rapport au laser de photoporation. La position du noyau des cellules est enregistrée pendant la segmentation et placé dans le plan XY de l'échantillon pour les localiser (représentation ***(i)*** fig.2.13a).

La moyenne d'intensité de fluorescence mesurée est attribuée à chaque position occupée par un noyau détecté (l'axe vertical sur la représentation ***(ii)*** fig.2.13a). Un échantillonnage du plan XY permet un découpage en 34×34 zones i, j contenant n_{ij}^{tot} cellules tel que $n_{ij}^{\text{tot}} = n_{ij}^{+} + n_{ij}^{-}$ la somme du nombre de cellules avec une fluorescence supérieure ou inférieure au seuil $2 * \sigma_{\text{cam}}$ représenté par un plan (vert). Le rapport $\tau_{ij} = n_{ij}^{+}/n_{ij}^{\text{tot}}$ défini pour chaque zone i, j est la fraction positive locale (graphique ***(iii)*** fig.2.13a). L'échantillon est ainsi cartographié suivant les fractions positives en fonction de la position dans la boîte de culture, en l'occurrence, de la position dans la distribution d'intensité du laser de photoporation (description de la démarche en annexe C).

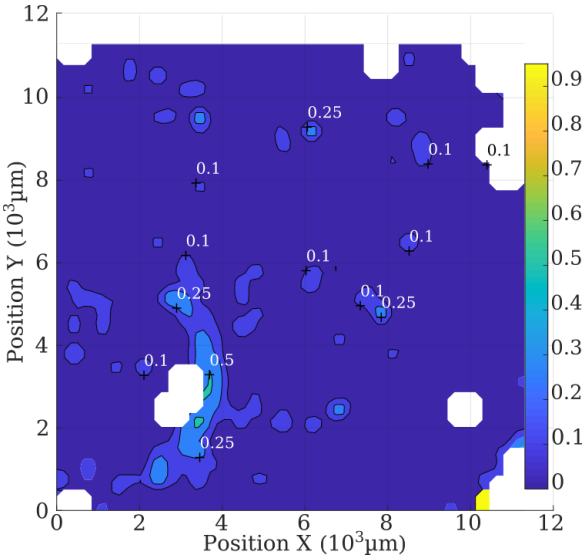
La fraction positive spatiale, appliquée à l'échantillon contrôle laser (sans AuNP), est homogène sur toute la surface $\leqslant 5\%$ (fig.2.13b). Une zone en position (4,4) mm présente une fraction locale $\sim 25\%$ corrélée spatialement avec une forte densité surfacique de cellules. La fraction élevée relativement au reste de la surface est probablement dû à des faux négatifs pendant l'étape de segmentation. En cas de forte confluence, la délimitation des noyaux détectés est difficile créant des noyaux beaucoup plus gros que les critères de tailles appliqués pendant l'analyse.

L'échantillon photoporé avec $\sim$ 8part./cell. contient deux zones avec des fractions positives locales variables. L'étendue dans la zone $Y = [0, \sim 8]$ mm qui recouvre à peu près 70% de la surface totale a des fractions positives d'environ 95% au point (5,6.25) par exemple. La zone pour $Y \geqslant 8$ mm a des fractions décroissantes de 80% à $30 - 50\%$. Il n'y a pas de corrélation avec la confluence puisque la répartition de la densité cellulaire est homogène sur tout le plan XY (graphique ***(i)*** fig.2.13a). Cependant, qualitativement, l'orientation de la distribution dans le plan XY des cellules positives – décroissance des fractions positives – est corrélée au profil spatial d'intensité des impulsions laser appliquées.

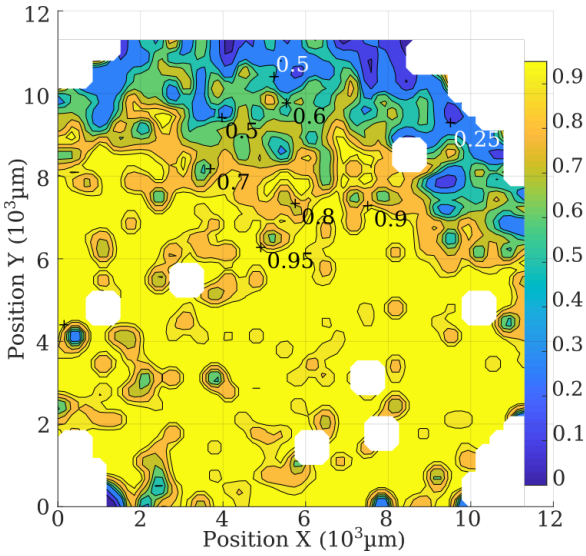
Selon la position des cellules (et les nanoparticules adsorbées) par rapport au maximum d'intensité du faisceau laser elliptique, l'excitation des nanoparticules est différente. En effet, la photoporation conduit à des nanopores variables selon le mécanisme privilégié dans les conditions de fluences (fig.2.1) par rapport au seuil



(a) Transformation des niveaux d'intensité individuels d'un échantillon en fraction positive locales (exemple : échantillon photoporé)



(b) Cartographie des fractions positives pour le contrôle laser (barre de couleur en fraction d'unité)



(c) Cartographie des fractions positives pour l'échantillon photoporé (barre couleur en fraction d'unité)

FIGURE 2.13 – **Cartographie des fractions positives locales.**
Fig. a) Les images prises à $t_{\text{réf}}$ sont réorganisées pour reconstituer l'échantillon ((script en annexe C). Une étape de segmentation permet de localiser les cellules dans le plan XY (graphique ***(i)***). Chaque cellule est définie par sa fluorescence moyenne et par rapport au seuil utilisé pour la définition de la fraction positive $\sim 2 * \sigma_{\text{cam}}$ (graphique 3D ***(ii)***). Un échantillonage suivant X et Y définit localement une zone d'une fraction locale positive τ_{ij} *i.e.* nombre de cellules positives (au delà du seuil) sur le nombre de cellules de la zone. **Fig. b)**. Cartographie de la fraction positive de l'échantillon contrôle laser. La fraction positive locale (carte couleur) sur la surface traitée par laser est globalement inférieure à 5%. **Fig. c)** La représentation issue de la méthode fig.a pour l'échantillon photoporés. Deux zones sont remarquables. $\sim$ 70% de la surface cartographiée de l'échantillon présente des fractions locales à $\geqslant$ 90%. Le reste de la surface a des taux $\leqslant$ 80%. Avec l'orientation du balayage, cette disposition est corrélée avec la distribution d'intensité du laser.

de génération de nano-bulles de vapeur. Une approche plus quantitative est faite dans la sous-section suivante sur des conditions de concentration de nanoparticules. La matrice de fractions positives locales est moyennée suivant l'axe Y et comparée au profil spatial du laser, obtenu par excitation d'une solution de rhodamine B en boîte de culture (fig.2.5b). La corrélation spatiale détermine alors le seuil de génération de nano-bulles de vapeur.

3.2 Effet de la concentration de nanoparticules sur la perméabilisation

Le nombre de nanopores créés par photoporation dépend du nombre de nanoparticules adsorbées aux membranes cellulaires. Il est contrôlé indirectement avec la concentration de nanoparticules en suspension pendant l'étape de pré-incubation. Il influe sur la quantité de FITC-Dextran incorporée par diffusion dans le cytoplasme. La concentration de la macromolécule dans la cellule $\phi(t)$ évolue dans le temps, dans le cas d'un pore, selon :

$$\phi(t) \sim \phi_0 \exp(-\frac{t}{\tau_{\text{diff}}}) \tag{1}$$

où ϕ_0 la concentration initiale et τ_{diff} la constante de temps de diffusion à travers le nanopore créé [74]. Le temps caractéristique dépend du rayon du nanopore, du coefficient de diffusion de la molécule exogène et des dimensions de la cellule. Pour prendre en compte le nombre de pores, le rayon r est donné par $r(N) = \sqrt{N} r_s$ avec N le nombre de nanopores et r_s le rayon individuel :

$$\tau_{\text{diff}} \sim \frac{(e + 2\pi r(N)/4)V}{\pi r(N)^2 D} \tag{2}$$

avec e, V et D l'épaisseur de la membrane, le volume de la cellule et le coefficient de diffusion respectivement [110]. Le nombre de nanopores (et donc de nanoparticules) influe sur la dynamique d'incorporation du FITC-Dextran. Avec une concentration ambiante fixée et des temps ($\sim 3-5$ min après irradiation) grands devant la durée de réparation de la membrane ($\leqslant 1$ min), la concentration finale de FITC-Dextran incorporée, et indirectement la fraction positive globale, atteint son régime permanent. Cependant, le nombre de nanoparticules (passé de 8 à 16 part./cell.) peut impacter la viabilité des cellules et par conséquent la fraction de cellules positives [71].

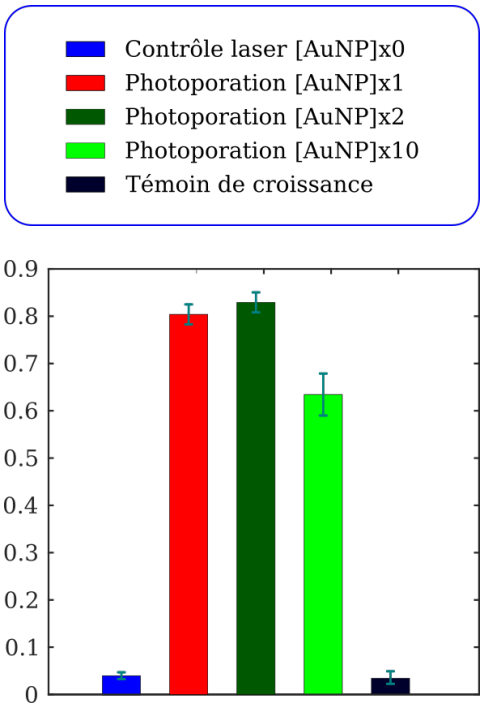
3.2.1 Fraction positive globale et viabilité de la photoporation

La puissance laser et les dimensions du faisceau sont fixées aux valeurs nominales du pic de fluence à ~ 2.6 J/cm^2. Quatre échantillons sont traités par laser à différentes concentrations de suspension de nanoparticules. La concentration nulle est le contrôle laser ([AuNP] $\times$ 0). Trois autres gammes de concentrations ([AuNP] $\times$ 1, 2 et 10) correspondant à $\sim$ 8, 16 et 80 part./cell. sont appliquées aux cellules pour la photoporation.

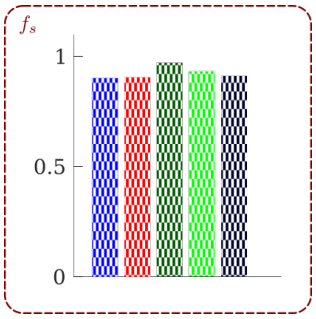
La fraction positive globale est similaire entre les traitements avec $\sim$ 8 part./cell. à $80 \pm 2\%$ et $\sim$ 16 part./cell. à $83 \pm 2\%$ (fig.2.14a). À ces ordres de grandeurs, la variation du nombre de nanopores créés influe peu sur la performance globale de photoporation. La multiplication de la concentration d'un facteur 10 décroît la fraction positive globale à $63 \pm 4\%$. L'analyse faite 24 h après photoporation intègre implicitement la viabilité cellulaire.

Cependant, le facteur de survie f_s ne varie pas significativement entre les échantillons photoporés ou de contrôle ($\sim 94 \pm 4\%$). L'impact du nombre de nanopores créés n'est pas immédiat puisque la perte de cellule ne dépasse pas la fraction de $\sim 10\%$ (fig.2.14b). Le facteur de croissance f_c indique que les cellules photoporées se multiplient d'un facteur 1.7, 1.5 et 1.7 pour [AuNP] $\times$ 1, 2 et 10 respectivement, alors que les contrôles sont entre 1.7 et 1.9 ± 0.2 (fig.2.14c).

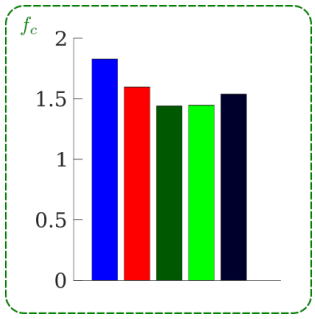
La fraction de cellules rondes indique également peu de différences entre les conditions (fig.2.14e et d). Avec des fractions de références $\leqslant 10\%$, la croissance qui apparaît avec la concentration ([AuNP] $\times$ 0, 1, 2 et 10) est de l'ordre de l'incertitude de l'analyse de la segmentation d'image. L'évolution de cette partie de la popula-



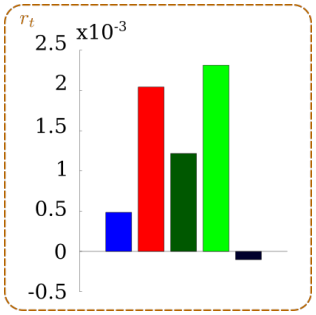
(a) Fraction positive globale selon la concentration de nanoparticules



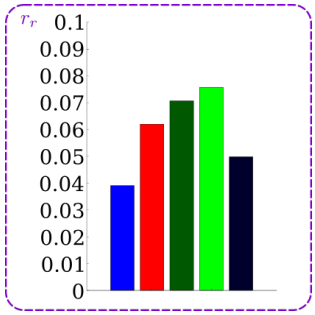
(b) Facteur de survie f_s des conditions de photoporation



(c) Facteur de croissance f_c des conditions de photoporation



(d) Évolution du nombre de cellules rondes (r_t) des conditions de photoporation



(e) Fraction de référence de cellules rondes (r_r) des conditions de photoporation

FIGURE 2.14 – **Perméabilisation par photoporation en fonction de la concentration de nanoparticules.**
Les figures sont obtenues en appliquant la démarche de la fig.2.11 pour la fraction positive globale et de la fig.2.10 pour l'extraction des grandeurs de viabilité. Les quatre échantillons (2 contrôles et 3 concentrations de nanoparticules pour la photoporation) sont présentés. **Fig.a)** Le contrôle laser donne des fractions positives de $4 \pm 1\%$. Les concentrations $\times 1$ (pour ~ 8 part./cell.) et $\times 2$ (pour ~ 16 part./cell.) génèrent des fractions positives de cellules équivalentes de $80 \pm 2\%$ et $83 \pm 2\%$ respectivement. L'augmentation du nombre de nanoparticules adsorbées d'un facteur 10 réduit la fraction positive à $63 \pm 4\%$, conséquence possible d'une mortalité entre le traitement et l'imagerie ~ 24 h après. **Fig.b)** Le facteur de survie (rapport du nombre de cellules après et avant traitement) indique que $\sim 90\%$ des cellules sont récupérées après le traitement laser. Il n'y a pas de mort cellulaire significative par rapport aux échantillons de contrôle. **Fig.c)** Les facteurs de croissance (multiplication en 24 h) sont entre 1.5 et 1.7, ce qui est cohérent avec les valeurs des contrôles. **Fig.d)** L'évolution temporelle du nombre de cellules rondes après le traitement laser n'indique pas de corrélation avec l'augmentation de la concentration. **Fig.e)** La fraction de référence (densité de cellules rondes à $t \approx t^-_{\text{réf}}$) est globalement en dessous de 8% dans tous les échantillons et la croissance visible avec la concentration n'est pas significative compte tenu des incertitudes de segmentation. Les figures représentant les grandeurs de viabilité f_s, f_c, r_t et r_r n'expliquent pas l'écart entre les fractions positives globales obtenues avec ~ 8 part./cell. et ~ 80 part./cell..

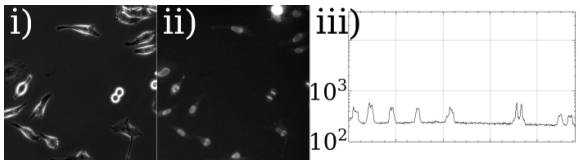
tion dans le temps reste très faible, sans corrélation visible avec la concentration de nanoparticules adsorbées. L'augmentation de la concentration de nanoparticules par cellules d'un facteur 2 ou 10 n'entraîne pas la mort cellulaire de façon significative.

3.2.2 Marquage à l'échelle de la cellule unique (FITC-Hoechst)

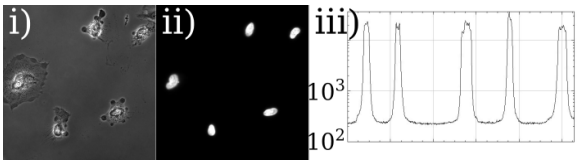
La fraction positive globale révèle des différences significatives entre les concentrations basse et haute de nanoparticules (respectivement $\sim 80\%$ et $\sim 60\%$). Cette fraction intègre la viabilité du protocole car il est établi 24 h après le traitement par photoporation ($t_{\text{réf}} = 0$ h), mais les grandeurs de croissance n'indiquent pas de différence de viabilité (fig.2.14). Les diagrammes de corrélations comparent des mesures de fluorescence FITC

et Hoechst pour déterminer la cause de l'écart entre les fraction positive globales.

Le marquage Hoechst sert à détecter les noyaux des cellules pour une segmentation d'images plus simple. Il pénètre la membrane et se lie aux régions riches en adénine et thymine de l'ADN. L'intensité de fluorescence peut varier selon l'état de la cellule et son endommagement (fig.2.15). Il peut être indicateur d'un état apoptotique (fig.2.15b) [133]. La corrélation entre les fluorescences Hoechst et FITC est explorée à l'échelle de la cellule unique pour compléter les évaluations globales.

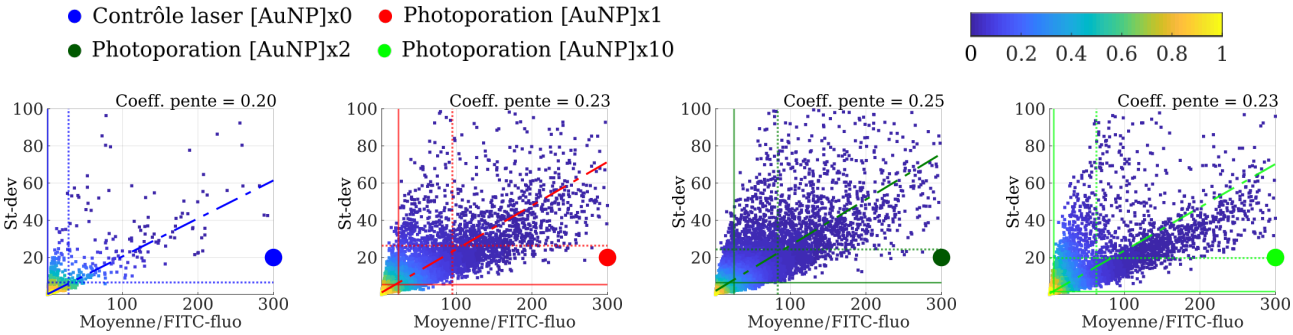


(a) Marquage Hoechst sur cellule vivante



(b) Marquage Hoechst sur cellule apoptotique

FIGURE 2.15 – **Différence de marquage Hoechst selon l'état cellulaire.**
Les images *(i)*, *(ii)* et *(iii)* sont respectivement l'image en lumière blanche, image du marquage Hoechst et profil d'intensité du marquage Hoechst émis par les noyaux. **Fig.a)** Intensité de fluorescence émise par des cellules contrôles marquées avec le Hoechst. Le maximum d'intensité est autour de ~ 500 u.a. **Fig.b)** Intensité de fluorescence émise par des cellules apoptotiques marquées avec le Hoechst. Le maximum d'intensité est autour de $\geqslant 2 \cdot 10^4$ u.a.



(a) Diagramme pour [AuNP] $\times 0$

(b) Diagramme pour [AuNP] $\times 1$

(c) Diagramme pour [AuNP] $\times 2$

(d) Diagramme pour [AuNP] $\times 10$

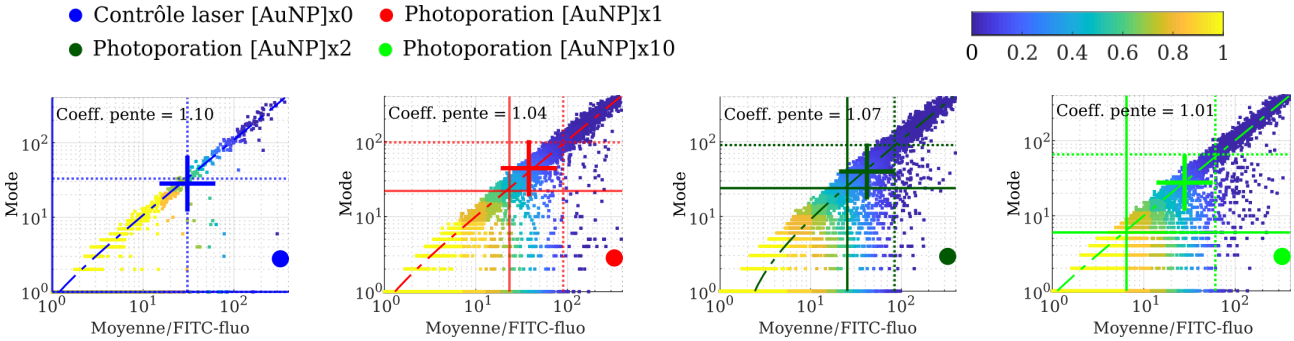
FIGURE 2.16 – **Fluorescence FITC intracellulaire individuelle des échantillons perméabilisés en fonction de l'écart-type**
Représentation en diagramme de dispersion de l'écart-type en fonction de la moyenne de la fluorescence exprimée par une cellule individuelle. **Fig.a)** Diagramme de l'échantillon contrôle laser. Les traits pleins (horizontaux et verticaux) repère la valeur de la médiane de tout l'échantillon (1 pour la moyenne, 0.05 pour l'écart type). Les traits en pointillés représente $\pm\sigma$ l'écart-type de la grandeur (27 et 6 respectivement) autour de la médiane. Les coefficients affichés sont les pentes des courbes de tendance (point-tirets). Le code couleur (carte dans la légende) indique la densité relative de points. **Fig.b, c et d)** Diagrammes des échantillons photoporés avec ~ 8, 16, 80 part./cell. respectivement. La dispersion des deux grandeurs (traits en pointillés) indiquent que les échantillons avec nanoparticules ont des efficacités d'incorporation très similaires. Les médianes sont cohérentes avec la fig.2.14a et indique que l'efficacité d'incorporation est plus faible pour l'échantillon $\times 10$. La densité de points est plus faible autour de $[100, 200]$ pour des écarts-type supérieurs dans les échantillons $\times 1, 10$ en comparaison avec $\times 2$.

Fluorescence FITC

La corrélation entre écart-type et moyenne de fluorescence FITC à l'échelle individuelle permet de décrire la qualité d'incorporation du FITC-Dextran (exemple fig.2.12). Le coefficient de pente des courbes de tendance pour [AuNP] $\times 0$, 1 et 2 croît légèrement avec la concentration, respectivement 0.2, 0.23 et 0.25 (fig.2.16a, b et c). Ces valeurs restent proches mais indiquent des différences de répartition des points.

Les médianes de la fluorescence moyenne (traits pleins verticaux 1, 23.3 et 25.4 pour [AuNP] $\times$ 0, 1 et 2 respectivement) indiquent que le nombre de nanoparticules croissant crée sensiblement plus de cellules fluorescentes (taux globaux à 80 et 83% fig.2.14a) : il y a plus de probabilité de créer des nanopores. La dispersion de la moyenne (traits pointillés verticaux 28.7, 94.6 et 83.1) traduit en revanche qu'il n'y a pas pour autant une meilleure incorporation à l'échelle de la cellule (la condition $\times$2 est même plus restreinte que $\times$1 avec moins de valeurs hautes). La concentration finale ϕ incorporée par la cellule (éq.1 page 39) atteint son régime permanent malgré le facteur $\leqslant \sqrt{2}$ (éq.2 page 39) pour le temps de diffusion dû au nombre de nanopores créés.

L'échantillon [AuNP] $\times$ 10 a une pente à 0.23, identique à [AuNP] $\times$ 1. Mais sa fluorescence moyenne présente une médiane beaucoup plus faible ($\sim$ 6.5) pour une dispersion ($\sim$ 56) traduisant encore moins de valeurs hautes que [AuNP] $\times$ 2 (fig.2.16d). L'allure du nuage de points reste particulière en comparaison avec les concentrations [AuNP] $\times 1, 2$. Deux zones apparaissent : pour les moyennes $\leqslant$ 60 (trait pointillé vertical), le nuage a une pente plus forte que les moyennes supérieures. Cette tendance apparaît également dans l'échantillon contrôle. L'adsorption de $\sim$ 80 part./cell. génère deux types de cellules photoporées : petite intensité peu uniforme et grande intensité plus uniforme.



(a) Diagramme pour [AuNP] $\times$ 0

(b) Diagramme pour [AuNP] $\times$ 1

(c) Diagramme pour [AuNP] $\times$ 2

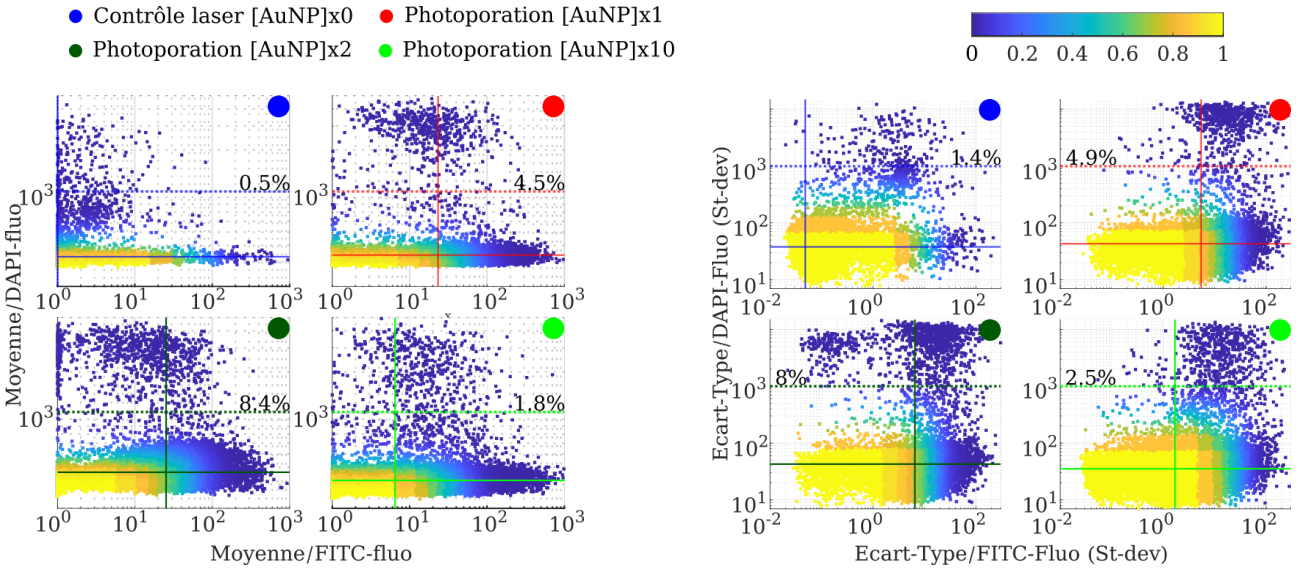
(d) Diagramme pour [AuNP] $\times$ 10

FIGURE 2.17 – **Fluorescence FITC intracellulaire moyenne des échantillons perméabilisés en fonction du mode**
Représentation en diagramme de dispersion du mode en fonction de la moyenne de la fluorescence exprimée par une cellule individuelle. **Fig.a)** Diagramme de l'échantillon contrôle laser. Les traits pleins (horizontaux et verticaux) repèrent la valeur de la médiane de tout l'échantillon (1 pour la moyenne, 0.05 pour l'écart type). Les traits en pointillés représentent $\pm\sigma$ l'écart-type de la grandeur (27 et 6 respectivement) autour de la médiane. Les coefficients affichés sont les pentes des courbes de tendance (point-tirets). Le code couleur (carte dans la légende) indique la densité de points relative. La croix correspond à la médiane des grandeurs sur la population tronquées à des cellules avec une moyenne de fluorescence $\geqslant 6\sigma_{\text{cam}}$. **Fig.b, c et d)** Diagrammes des échantillons photoporés avec $\sim$ 8, 16, 80 part./cell. respectivement. Les coefficients des pentes et la répartition des points impliquent une plus grande dispersion du mode pour $\times 2, 10$ comparé à $\times$1. Pour les sous-échantillons avec une moyenne $\geqslant 6\sigma_{\text{cam}}$, [AuNP] $\times$ 1 et [AuNP] $\times$ 2 ont des valeurs de médiane autour de 40, [AuNP] $\times$ 0 et [AuNP] $\times$ 10 autour de 30, mais l'écart-type reste supérieur pour le contrôle laser (180 contre 80).

La corrélation entre mode et moyenne donne une pente proche de l'unité pour toutes les conditions de photoporation (fig.2.17). La fluorescence est donc uniforme dans la zone du noyau. En appliquant un seuil supérieur ($\sim 6\sigma_{\text{cam}}$ au lieu de $2\sigma_{\text{cam}}$) à la fluorescence moyenne, la médiane des distributions tronquées des cellules "fortement" fluorescentes est représentée par les croix (fig.2.17a, b, c et d). Pour la moyenne ou le mode, les 4 conditions sont comparables deux à deux : [AuNP] $\times$ 1 et [AuNP] $\times$ 2 ont des valeurs de médiane autour de 40, [AuNP] $\times$ 0 et [AuNP] $\times$ 10 autour de 30. Les écarts-type des modes sont similaires pour les échantillons avec

nanoparticules et ~ 2 fois plus grand pour l'échantillon contrôle laser ([AuNP] $\times$ 0).

La fluorescence à l'échelle de la cellule unique est comparable entre les trois gammes de concentrations et reste cohérente avec la création de nanopores par le traitement laser. Cependant, l'échantillon traité avec ~ 80 part./cell. ([AuNP] $\times$ 10) marque quelques différences. La corrélation entre moyenne et écart-type conduit une distribution de points différente avec moins de cellules fortement fluorescentes (une tendance qui semble débuter pour la concentration $\times 2$) et la réduction des échantillons aux cellules fluorescentes donne une corrélation entre moyenne et mode comparable au contrôle laser.



(a) Diagrammes de dispersion de la moyenne de la fluorescence Hoechst par rapport à FITC

(b) Diagrammes de dispersion l'écart-type de la fluorescence Hoechst par rapport à FITC

FIGURE 2.18 – **Fluorescence FITC et Hoechst intracellulaire des échantillons perméabilisés.** Les traits pleins (horizontaux et verticaux) repèrent la valeur de la médiane de tout l'échantillon. Les courbes en pointillés horizontales marquent la part de la population au delà d'un seuil. Le code couleur (carte dans la légende) indique la densité de points relative. **Fig.a)** Corrélation de la moyenne des fluorescences FITC et Hoechst. Les médianes du canal Hoechst sont très proches entre les trois échantillons (320-360 u.a.) mais pour les échantillons pré-incubés avec des nanoparticules, des sous-groupes représentant 4.5, 8.4 et 1.8% respectivement pour [AuNP] $\times$ 1, 2 et 10 pour une part à 0.5% pour l'échantillon contrôle laser. Ces sous-populations correspondent à des valeurs intermédiaires de fluorescence FITC ($\leqslant$ 10 u.a.). **Fig.b)** Corrélation de l'écart-type des fluorescences FITC et Hoechst.

Corrélation entre FITC-Dextran et Hoechst

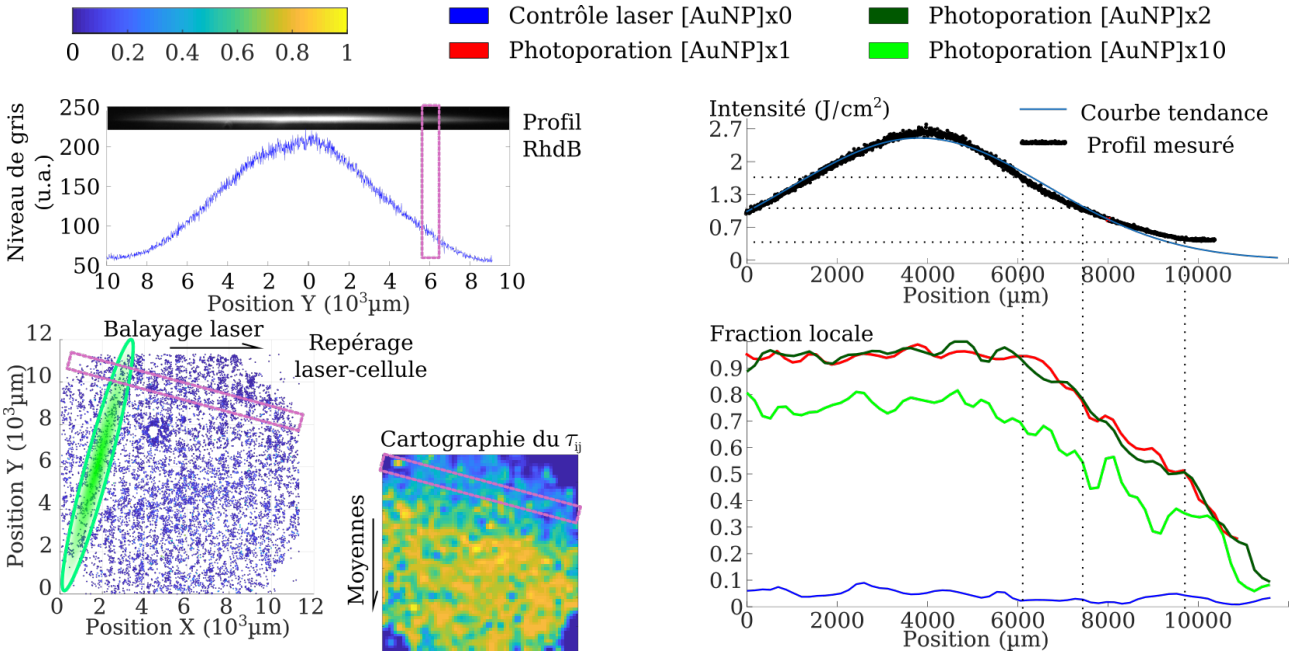
Le marquage Hoechst est effectué 15 min avant l'imagerie avec le 20x à température ambiante. Les cellules sont maintenues dans du DPBS(+ + -) pendant le processus pour éliminer l'auto-fluorescence du milieu de culture avec rouge de phénol. Le marquage Hoechst ne peut impacter la viabilité ou le temps de prolifération qu'après quelques jours (2-7) [134]. Une variabilité a été rapportée pour des température inférieures à 20°C et des durées (24 h) après marquage qui peut être négligée dans les conditions d'imageries choisies [135, 136].

La corrélation entre les deux fluorescences FITC et Hoechst révèle des sous-ensembles de points pour des moyennes de fluorescence Hoechst élevées, dans le cas des concentrations [AuNP] $\times$ 1, 2 et 10, qui correspondent à des intensités intermédiaires de FITC (fig.2.18). Le décalage vers les hautes intensités de marquage Hoechst observable, dans le cas d'échantillons avec nanoparticules, a déjà été observé dans le cas de dommages induits chimiquement aux cellules [137]. L'émission de fluorescence est plus importante dans le cas de cellules

dans des stades apoptotique ou mitotique par rapport à des cellules viables [133]. Il ne représentent cependant que $\leqslant 8$ % de la population totale, une fraction cohérente avec les grandeurs de viabilité (fig.2.14).

Les écarts entre les différents échantillons restent faibles et n'expliquent pas, *via* le marquage Hoechst, la répartition des points observée sur les digrammes FITC (fig.2.17). La valeur élevée du nombre de nanoparticules par cellules a donc eu une influence sur l'étape de pré-incubation ou de traitement laser et non sur la viabilité.

3.2.3 Variabilité de la fluence laser



(a) Profil de Rhodamine B et de la fraction positive locale

(b) Correspondance entre profil d'intensité laser et profil de fractions positives locales

FIGURE 2.19 – **Corrélation du profil d'intensité du laser et des fractions positives spatiales**
À partir du profil de fluorescence de la rhodamine B par le laser, la cartographie des fractions positives locales est relié à l'intensité du laser. **Fig.a)** Le profil de fluorescence de la Rhodamine B est proportionnel à l'intensité laser. La densité de cellules placée sur la plan xy est convertie en matrice de fractions positives locales τ_{ij} . Le rectangle rose correspond à la zone de la population moyennée et mise en correspondance avec l'intensité selon la position du laser. **Fig.a)** Correspondance entre profil d'intensité (en haut) et profil moyenné des fractions positives locales (bas) pour des échantillons photoporés avec 0, ~ 8, ~ 16 et ~ 80 part./cell. La carte est tournée de 15° pour corriger le décalage entre traitement laser et imagerie. La tendance est assez claire : la fraction positive croît avec la fluence jusqu'à atteindre un plateau. On remarque que les conditions [AuNP] $\times 1,2$ sont très proches (maximum au voisinage de 95%). En revanche, l'échantillon $\times 10$ sature à $\sim 75\%$.

Le profil d'intensité du laser est exploité pour quantifier la cartographie présentée fig.2.13. Le profil d'intensité est obtenu par fluorescence de la Rhodamine B (expérimentalement, haut de la fig.2.19a). Il est ensuite orienté respectivement à l'échantillon étudié. Les valeurs cartographiées des fractions positives locales sont moyennées dans une direction perpendiculaire à l'axe du faisceau elliptique (bas de la fig.2.19a). Le profil d'intensité est complété par la simulation numérique effectuée fig.2.5a pour être approché par une fonction exponentielle décrivant l'évolution de l'intensité du laser le long de l'axe du faisceau (haut de la fig.2.19b). Cette courbe est comparée enfin au profil des fractions positives locales moyennées (bas de la fig.2.19b).

Les trois échantillons traités par photoporation avec nanoparticules d'or, dans la même configuration optique (intensité et dimension du laser de photoporation), indiquent des tendances voisines. La fraction positive locale croît jusqu'à atteindre un plateau. Dans le cas des "basses" concentrations ($\times 1,2$), les plateaux sont au voisinage de $\geqslant 95\%$ et décroissent jusqu'à atteindre $20-30\%$. L'échantillon à haute concentration de nanoparticules d'or ($\times 10$) plafonne entre $70-80\%$ pour décroître à des valeurs comparables aux deux premiers échantillons.

Qualitativement, le profil de fraction positive locale est corrélé avec la courbe d'intensité laser quelle que soit la concentration de nanoparticules utilisée (fig.2.19b). Ce lien se fait avec la perméabilisation de la membrane cellulaire. Sa dénaturation dépend de l'énergie apportée aux nanoparticules plasmoniques et son transfert, thermique ou acousto-mécanique. Ces deux phénomènes de photoporation peuvent être discriminés par rapport à un seuil de la fraction positive ($\sim 30-40\%$) [138].

Dans le régime de génération de nano-bulles de vapeur, la fraction positive suit la croissance de l'intensité de l'impulsion laser de 30 à $\sim 50\%$ pour des gammes de fluence de l'ordre de 0.2 J/cm^2 [139]. Cette évolution s'explique par la relation entre énergie déposée et rayon de la nano-bulle de vapeur. Les seuils de génération de nano-bulles, rapportés dans la littérature pour des impulsions de l'ordre de la nanoseconde et des tailles comparables de nanoparticules d'or (~ 70 nm), varient entre ~ 0.05 et 0.2 J/cm^2 selon le milieu et la sensibilité de détection. Mais le rayon, et par conséquent la contrainte mécanique émise pendant le processus, croît avec la fluence pour atteindre le seuil d'endommagement de la membrane cellulaire [81, 140].

Parallèlement, la modulation du rayon de la bulle par la fluence influe sur la taille des nanopores créés. Ce dernier paramètre intervient dans la taille des molécules incorporées mais aussi sur le temps d'incorporation (éq.1 page 39 et 2 page 39). Pour un nombre de nanopores et une durée de réparation fixés, plus le rayon est petit et plus τ_{diff} est grand. La diffusion de l'exomolécule à l'intérieur du cytoplasme est donc réduite et la fluorescence exprimée est moindre en comparaison avec des pores de plus grandes tailles [71, 110].

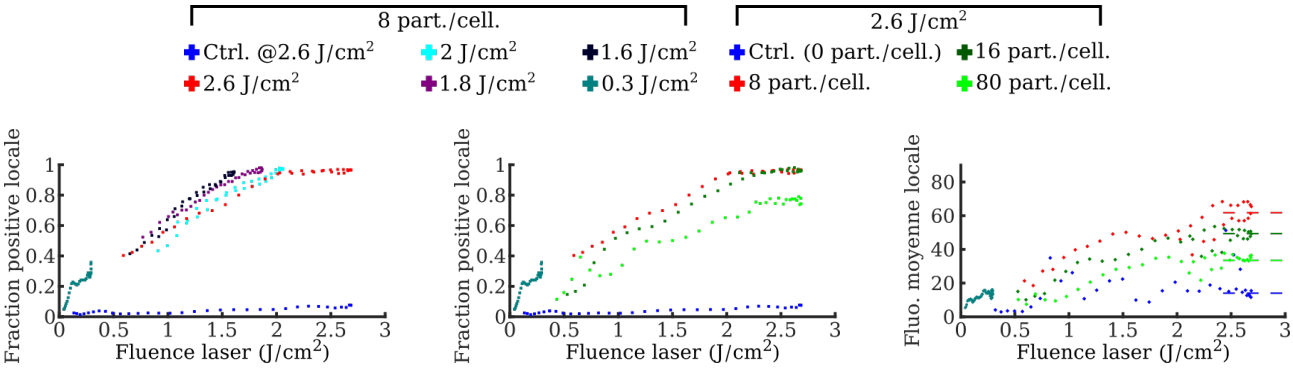
L'allure de la fraction positive à l'échelle d'un échantillon doit être mis en relation avec la valeur locale de l'intensité (fig.2.19). Les deux profils (fraction et intensité) sont centrés en utilisant une courbe de tendance pour ajuster le positionnement du laser par rapport à l'échantillon. La même approche est à suivre pour la fluorescence moyenne exprimée par les cellules en maintenant les positions de références obtenues pour la fraction positive.

3.3 Variabilités dans le processus de photoporation

Les fractions positives globales ou locales mesurées pour les échantillons photoporés avec différentes concentrations de nanoparticules révèlent un écart significatif entre l'échantillon avec ~ 80 part./cell. et les échantillons à respectivement ~ 8 et 16 part./cell. (63 contre $\sim 80\%$). À configuration optique fixée, deux variabilités sont à considérer : la fluence à l'échelle de l'échantillon et la concentration ambiante de FITC-Dextran d'échantillon à échantillon.

Ce dernier paramètre de concentration influe sur la fluorescence exprimée par les cellules photoporées. Des fluctuations peuvent exister pendant la préparation de la solution (pesée, dilution). Il faut confirmer le faible impact des petites variabilités expérimentales. Le premier paramètre de la fluence conditionne la contribution physique à la perméabilisation membranaire des cellules photoporées soit thermique ou mécanique (nano-bulles de vapeur).

3.3.1 Seuil de photoporation par nano-bulles de vapeur



(a) Évolution de la fraction positive avec l'intensité à concentration fixée

(b) Évolution de la fraction positive avec l'intensité à fluence fixée

(c) Évolution de la fluorescence moyenne avec l'intensité

FIGURE 2.20 – **Évolution en fonction du profil d'intensité du laser des fractions positives à concentration et/ou à fluence maximale fixées**
Les courbes sont obtenues à partir des profils de la fig.2.19b. Chaque point correspond à un champ de visualisation pendant l'imagerie. **Fig.a)** Évolution de la fraction positive locale en fonction de la fluence pour différentes valeurs de fluence maximale ($I_{\max}$) ("8 part./cell." dans la légende") à concentration de nanoparticules fixée. Les échantillons traités avec $I_{\max} \geqslant 1.6$ J/cm^2 coïncident pour une fluence à ~ 2 J/cm^2 pour une fraction positive maximale ($\geqslant 90\%$). L'échantillon à 0.3 J/cm^2 ne dépasse pas 40%. Cette fluence caractérise la photoporation thermique dans la littérature [71]. **Fig.b)** Évolution de la fraction positive locale en fonction de la fluence pour différentes valeurs de concentration de nanoparticules [AuNP] $\times$ 0, 1, 2, 10 correspondant à $\sim$ 0, 8, 16 et 80 part./cell. respectivement ("2.6 J/cm^2" dans la légende") à $I_{\max}$ fixée. L'échantillon traité à 0.3 J/cm^2, [AuNP] $\times$ 1, est inclus pour comparaison. Le facteur ~ 10 du nombre de nanoparticules par cellules fait chuter la valeur du palier de $\sim 20\%$ pour les hautes fluences. **Fig.c)** Évolution de la fluorescence moyenne locale en fonction de la fluence pour différentes valeurs de concentration de nanoparticules. La population est seuillée pour ne prendre en compte que les cellules fluorescentes comptabilisées pour établir la fraction positive (n_{ij}^{+} de la fig.2.13a). Les barres horizontales indiquent la valeur moyenne de la fluorescence au voisinage de $I_{\max}$. Les échantillons sont classées en fluorescence selon la concentration décroissante. L'écart entre l'échantillon à 0.3 et 2.6 J/cm^2 est caractéristique des deux phénomènes de photoporation : thermique et par nano-bulles de vapeur.

La fraction positive obtenue dans le cas d'une photoporation avec 8 part./cell. atteint un plateau à $\geqslant 95\%$ pour des valeurs de fluence $\sim 1.8 - 2$ J/cm^2 (fig.2.20a). Ces échantillons sont traités avec différentes valeurs de maximum de fluence en variant la puissance optique injectée. Pour des maxima entre 1.6 et 2.6 J/cm^2, les fractions positives locales suivent des tendances très voisines en fonction de la fluence et l'écart s'explique entre autre par l'incertitude de placement de la distribution d'intensité obtenue par imagerie de la Rhodamine B par

rapport à l'échantillon.

Le seuil de fluence pour la génération de nano-bulles de vapeur autour de nanoparticules plasmoniques est couramment étudié dans la littérature [76, 81, 141]. Sa détermination se base sur la détection de fluctuations de pression dans le milieu générées par la dynamique des nano-bulles ou la dispersion d'une sonde optique (laser) par le changement d'indice (interface liquide-vapeur). Deux seuils sont à distinguer : la création de nano-bulles (génération, physique) et la création de nanopores par nano-bulles (poration, biologique).

Par convention, le seuil de génération correspond à la valeur d'intensité pour laquelle il y a 50% de probabilité de générer des nano-bulles [81]. Pour des nanoparticules de diamètre entre 60 et 90 nm excitées par des impulsions courtes ($\sim$ 5 ns), l'excitation nécessaire est évaluée à $\sim 0.06 - 0.3$ J/cm^2 [81, 140, 142]. Ce même seuil de génération est aussi déterminé par le nombre de nano-bulles observées sur un groupe de nanoparticules excitées optiquement. Dans le cas où ces dernières sont isolées (non adsorbées aux cellules), les premières nano-bulles apparaissent vers 0.25 J/cm^2 et leur nombre sature autour de $\sim$ 1 J/cm^2 [8, 143].

Le seuil de poration est différent du seuil de génération puisque la pression émise par la nano-bulle dépend de sa taille et donc de l'énergie injectée. Selon le type cellulaire, le seuil d'endommagement de la membrane varie. *Via* les fractions positives, le seuil de poration est généralement de $\sim$ 1 J/cm^2 pour des impulsions d'excitation de l'ordre de la nanoseconde [112, 139, 144]. Les cellules photoporées à $\sim$ 0.3 J/cm^2 (dans les fig.2.20a et b) correspond donc à des gammes de fluences d'excitation entraînant un effet thermique et potentiellement un début de génération de nano-bulles.

La fraction positive dans ces conditions ($I_{\max} \sim 0.3$ J/cm^2 avec $\sim$ 8 part./cell.) croît rapidement jusque $I \approx 0.1$ J/cm^2 pour atteindre $\sim$ 20%. L'évolution de la courbe peut s'expliquer par la hausse de la température des nanoparticules qui augmente la fraction positive, si l'on considère que la contribution principale est photothermique. L'évolution est moins rapide entre 0.1 et 0.25 J/cm^2 et cette gamme correspond aux observations des premières nano-bulles pour une configuration plasmonique similaire (nanoparticules à $\sim$ 70 nm et durée de l'impulsion à $\sim$ 5 ns) [8]. Il y a donc un régime permanent thermique et un début de génération de nano-bulles trop petites pour générer une perméabilisation de la membrane plus importante que la dénaturation thermique. Entre 0.25 et 0.3 J/cm^2, la fraction positive fluctue rapidement : il peut simplement s'agir de variabilité de traitement. Cependant, cela semble cohérent avec l'augmentation du nombre de site de nucléation de nano-bulles avec la fluence. En l'occurrence, sur plusieurs zones dans la même gamme de fluence, la réponse de transfection est très variable à cause de la variabilité des propriétés mécaniques des cellules [145, 146].

L'évolution de cette courbe peut tout à fait être un biais d'analyse (échantillonnage). Cependant, les fractions positives obtenues pour des gammes de fluences supérieures à la même concentration de nanoparticules croissent de manière à peu près monotone avec la fluence, cohérente avec l'augmentation du nombre de nano-bulles et des contraintes générées (fig.2.20a). Des évolutions similaires ont été observées dans des conditions très proches sur des cellules HeLa [71]. Cette première analyse des fractions positives locales indique l'existence d'un seuil de perméabilisation pouvant distinguer photoporation thermique (ou nano-bulles non efficaces) et photoporation par nano-bulles qui est $\leqslant 40\%$.

La fluorescence de la population de cellules tronquée (au delà du seuil utilisé pour la fraction positive $2 * \sigma_{\text{cam}}$) indique la quantité de molécule exogène incorporée pendant le traitement par photoporation (fig.2.20c). Les deux échantillons photoporés avec $\sim$ 8 part./cell. à respectivement 0.3 et 2.6 J/cm^2 ont des valeurs moyennes

de fluorescences très différentes avec $\sim 10-15$ u.a. pour le régime thermique présumé et ≥ 40 u.a. pour les gammes de fluences supérieures à 1 J/cm^2. Le facteur $3-4$ est cohérent avec des travaux antérieurs dans la littérature et est expliqué entre autre par la taille des pores créés mais aussi par la présence de jets induits par les nano-bulles de vapeur contribuant, avec la diffusion, à l'incorporation du FITC-Dextran à travers les nanopores créés [71, 112].

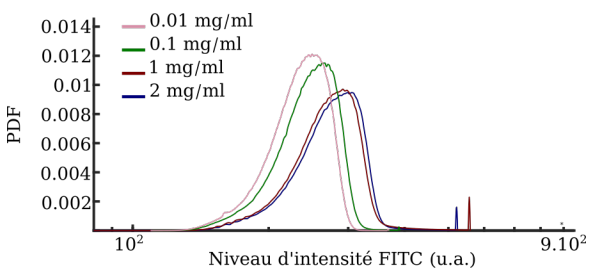
Sous réserve de pouvoir négliger les fluctuations de la concentration de FITC-Dextran ambiant, la fraction positive et la fluorescence moyenne locaux indiquent la présence de deux régimes de photoporation qui sont donc thermique et par génération de nano-bulles. En couplant les deux grandeurs, les seuils de génération et de poration par nano-bulles de vapeur correspondent à des valeurs de fluence entre 0.3 et 0.8 J/cm^2 de façon très cohérente avec la littérature et ce à concentration et rayon de nanoparticules fixés (~ 8 part./cell. et 70 nm) [8, 71]. L'augmentation de la taille des structure plasmoniques réduit généralement le seuil de génération de nano-bulles [140, 142]. Ces structures plasmoniques de tailles plus grandes peuvent être des nanoparticules de tailles plus grandes ou simplement des agglomérats de nanoparticules en cas de forte concentration dans le milieu.

L'évolution des fractions positives locales et des fluorescences moyennes locales à différentes concentrations de nanoparticules sont comparées à la concentration de références dans les deux régimes de fluence ($\leqslant 0.3$ et $\geqslant 1$ J/cm^2). La fraction positive pour les conditions à ~ 0, 8, et 16 part./cell. évolue de façon cohérente avec la fluence (fig.2.20b). En l'occurrence, le contrôle laser reste en deçà de 5% et les deux traitements avec nanoparticules suivent la même tendance à partir de ~ 1 J/cm^2 pour atteindre un palier autour de 95% de fraction locale. La photoporation avec ~ 80 part./cell. résulte en revanche en un palier de la fraction positive autour de ~ 2 J/cm^2 (similaire aux conditions avec nanoparticules) et est à $\sim 70\%$. Puisque la viabilité est similaire entre les échantillons et ne rend pas compte des $\sim 20\%$ d'écart (croissance et Hoechst sur les fig.2.14 et 2.18), l'absence de fractions positives locales supérieures dans cette échantillon ne s'explique pas par la perte de cellules. Des travaux sur différentes configurations de nanoparticules avancent que la présence de nanoparticules en suspensions entraîne des valeurs de seuils générations de nano-bulles similaires ou inférieures au cas de nanoparticules isolées [73, 81]. Par ailleurs, la forte concentration peut éventuellement entraîner la création de foyer d'agglomérats de nanoparticules dans la membrane cellulaire après l'étape de pré-incubation. Dans ce cas, le seuil de génération décroît également rendant la photoporation par nano-bulles plus simple et par conséquent l'obtention d'une fraction positive plus importante [8, 73, 126].

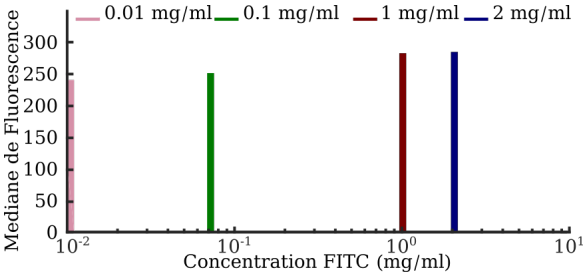
L'évolution de la fluorescence moyenne en fonction de la fluence est remarquable (fig.2.20c). Augmenter le nombre de nanoparticule et la fluence, intuitivement et sans considérer la fraction positive, entraînent plus de nanopores avec des rayons plus grands [71, 110]. Le temps de diffusion du FITC-Dextran (éq.2 page 39) est par conséquent réduit pour atteindre une concentration maximale à l'intérieur de la cellule. Cette dernière étant fixée par la concentration ambiante, la fluorescence moyenne locale devrait être similaire entre les trois conditions de concentration non nulles. Or, pour une taille de nanopores fixée à $I_{\max}$, la fluorescence moyenne est à ~ 60, 50 et 35 u.a. respectivement pour ~ 8, 16, et 80 part./cell.. L'hypothèse derrière cet écart non négligeable est que la multiplication des nanopores rallonge potentiellement le temps de réparation de nanopores. Ce temps reste court pour ne pas avoir d'impact sur la viabilité en cohérence avec des durées de réparation de la membrane observées de 2 à 20 min selon la technique de poration utilisée et la taille des nanopores créés [147, 148]. Dans l'hypothèse de l'occurrence de jets favorisant l'incorporation de l'exomolécule, il est possible que cette contribution entraîne une concentration élevée à l'intérieur de la cellule. Comme les temps sont comparables à τ_{diff} et que le gradient de concentration est vers l'extérieur de la membrane, le FITC-Dextran a le temps de diffuser vers l'extérieur. Si les nanopores ont une durée de vie plus longue que le temps écoulé avant l'étape de

rinçage, le FITC-Dextran va diffuser dans l'autre sens après élimination de la solution ambiante.

3.3.2 Variabilité de la concentration ambiante et du signal émis



(a) Histogrammes pour différentes concentrations de FITC-Dextran



(b) Fluorescence médiane de l'échantillon en fonction de la concentration initiale de FITC-Dextran

FIGURE 2.21 – **Variabilité de la photoporation liée à la concentration ambiante de FITC-Dextran. Fig.a)** Les histogrammes sont issus des images brutes en canal FITC. Cela revient à quantifier uniquement les cellules exprimant la fluorescence. **Fig.b)** Représentation des médianes des PDF en fonction de la concentration de FITC-Dextran. La réduction de la concentration de moitié dans deux distributions très voisines (médianes à 282 et 280 u.a). respectivement pour 2 et 1 mg/ml. La dilution au dixième ou au centième sont plus significativement différentes à 249 et 238 respectivement. Les éventuelles fluctuations dues aux dilutions ne seront pas influentes.

Des échantillons sont photoporés avec une fluence maximale $I_{\max} \sim 2$ J/cm^2 après pré-incubation pour avoir $\sim$ 16 part./cell.. Avant le traitement laser, le FITC-Dextran est rajouté à différentes concentrations (2 [nominale], 1, 0.1 et 0.01 mg/ml) et des images sont prises en fluorescence et quantifiées après photoporation (fig.2.21). Les valeurs de la fluorescence obtenues pour les échantillons à 1 et 2 mJ sont très proches et leur différence est comparable à la sensibilité de la caméra (médianes à 280 et 282). Il faut des fluctuations plus importantes comme une dilution au dixième pour avoir une diminution significative du signal de fluorescence (médiane $\leqslant 250$).

Les fluctuation de la concentration de FITC-Dextran en solution, pendant la préparation par exemple, ont un effet très faible sur le signal de fluorescence. L'analyse de la fluorescence moyenne locale effectuée semble donc pertinente (fig.2.20). Elle indique, d'une part, que la discrimination entre contribution thermique et par nano-bulle à la photoporation se fait par la fluorescence moyenne locale, *i.e.* la concentration intracellulaire de FITC-Dextran des cellules photoporées. D'autre part, cette concentration diminue en augmentant la surface effective de nanopores (le nombre par la concentration de nanoparticule et la taille par la fluence) sans corrélation avec une baisse de viabilité.

En conclusion, l'utilisation d'un faisceau de géométrie elliptique implique un profil spatial des fractions positives et des fluorescences moyennes. Une correspondance avec le profil de la fluence est faite pour déterminer l'intervalle de valeurs où débute la génération de nano-bulles de vapeur. La vérification de la sensibilité de l'acquisition d'image et de l'analyse à des variabilités de concentrations de FITC-Dextran mène à la conclusion que les écarts entre les échantillons irradiés avec différentes fluences sont dûs à la différence entre les mécanismes de perméabilisation impliqués, thermique ou par par génération de nano-bulles (fig.2.20c).

4 Conclusions : Photoporation par nano-bulles de vapeur

Plusieurs éléments ont été développés pour aboutir à la perméabilisation optimisée de cellules adhérentes en boîte de culture. Tout d'abord, le banc optique développé permet une la photoporation par intermédiaire des nanoparticules d'or. L'interfaçage des éléments du banc optimise l'étape d'irradiation pour traiter des échantillons d'environ 10^4 cellules en une dizaine de secondes. La perméabilisation des cellules est mesurée par le biais de l'incorporation d'une macromolécule de référence à concentration fixée (FITC-Dextran 10 kDa à 2 mg/ml). La quantification de la perméabilisation est faite par imagerie de fluorescence, analysée par des algorithmes de segmentation d'images. Les protocoles de préparation d'échantillons autour de la photoporation sont établis de façon à simplifier le traitement d'images et le recueil de données (fluorescence et viabilité).

La caractérisation de la photoporation s'est fait en se basant sur deux critères principaux : la viabilité et la fraction positive. La première grandeur, qui décrit l'effet d'un protocole sur le vie et la croissance des cellules, a été mesurée à l'échelle de l'échantillon sur deux à trois jours (évolution du nombre de cellules). Le taux de transfection est mesuré à la fois globalement et localement (ici, la fraction de cellules positives). Il est complété par la mesure de l'efficacité d'incorporation qui revient à mesurer la quantité de FITC-Dextran intracellulaire. Les résultats des échantillons photoporés sont alors comparés à ceux obtenus dans le cas d'échantillons de contrôle qui témoignent de la contribution des nanoparticules utilisées ou de la croissance normale de cellules non traitées.

Les taux de viabilité obtenus avec la photoporation avec différentes concentrations de nanoparticules est élevé (autour de $\sim 90\%$). La croissance des cellules irradiées n'est pas impactée puisque le facteur de croissance est comparable aux échantillons de contrôle. La morphologie des cellules et le marquage Hoechst, pouvant indiquer la présence de cellules en apoptose, sont cohérents avec la mesure de viabilité et ne révèle pas de corrélation entre hausse de la concentration à fluence fixée et baisse de la viabilité.

La fraction positive globale évalue donc la performance de photoporation en comparant le nombre de cellules exprimant la fluorescence par rapport au nombre total présent dans l'échantillon. Les trois valeurs de concentrations de nanoparticules – 8, 16 et ~ 80 part./ml – génèrent des fractions entre ~ 60 et $\sim 80\%$ de réponse positive. Les indicateurs de viabilité de ces protocoles sont comparables à ceux obtenus pour le témoin de croissance et n'expliquent donc pas l'écart entre la photoporation avec ~ 8 part./cell. avec une fraction global de $\sim 80\%$ et ~ 80 part./cell. avec une fraction $\sim 60\%$. La description de la fluorescence FITC indique cependant un effet de la concentration de nanoparticules sur le mécanisme d'incorporation : la fluorescence moyenne diminue à fluence fixée pour la photoporation avec ~ 80 part./cell..

La description globale de la perméabilisation des échantillons photoporés est cohérente une perméabilisation des membranes cellulaires par génération de nano-bulles. La littérature rapporte des valeurs de seuil de transfection au delà duquel la génération de nano-bulles est le mécanisme privilégié ($\sim 30 - 40\%$) [71, 138]. Ce dernier est dépendant de la fluence, le profil d'intensité du faisceau laser aboutit donc à différentes fractions positives ou d'incorporation du FITC-Dextran.

La fraction positive locale évolue spatialement à l'échelle d'un échantillon. La sensibilité de l'incorporation à la variabilité de la concentration du FITC-Dextran en solution dans le milieu étant faible, la variation de la fraction pour différentes valeurs maximales de fluences est donc corrélée avec la distribution d'intensité du faisceau laser lors de l'irradiation. La correspondance entre la distribution des fractions positives et de l'efficacité d'incorporation avec la valeur de la fluence localement indique une transition pour $I \sim 0.3$ J/cm^2 pour les deux

grandeurs de fluorescence. Dans la configuration étudiée, le seuil de génération de nano-bulles pour réaliser la photoporation se situe entre 0.3 et 0.8 J/cm^2. Dans cet intervalle, la fraction positive atteint $\sim 40\%$ et la fluorescence moyenne est multipliée par une facteur 4. Ces valeurs sont cohérentes avec les valeurs de la littérature qui caractérisent les mécanismes de photoporation thermique et par nano-bulles ($\sim 0.1 - 1$ J/cm^2) [81, 140, 142]. Les fluorescences moyennes locales concordent avec ces derniers résultats entre photoporation thermique et par génération de nano-bulles.

L'augmentation de la fluence locale génère des nano-bulles plus grandes et donc des nanopores plus grands. L'augmentation du nombre de nanoparticules par cellules induit un nombre de nanopores plus grand. Dans les deux cas, la surface effective de la perméabilisation est plus grande. La comparaison de la fluorescence indique que l'incorporation va varier selon le nombre de nanopores. On considère que la taille du nanopore r_s est liée au rayon maximal de la bulle et donc indirectement au rayon initial. Ce dernier varie comme $I^{1/3}$ [82]. Par ailleurs, on peut considérer que le rayon de la surface effective varie avec $N^{1/2}r_s$ avec N le nombre de nanopores et r_s le rayon individuel [110]. En première approximation, la surface effective évolue plus rapidement avec le nombre de nanoparticules plutôt qu'avec la fluence de l'irradiation. L'évolution de la fluorescence pour la concentration ($[AuNP] \times 10$) indiquerait donc qu'un nombre de nanopores plus important nécessiterait des temps de réparation plus long pendant lesquels le FITC-Dextran incorporé diffuse en dehors du cytoplasme, contrairement à des nanopores de taille plus restreinte. Cela expliquerait ainsi une fraction positive plus faible. Des essais sur différentes gammes de concentrations de nanoparticules corrélées avec la fluence à l'aide d'un faisceau laser de géométrie similaire permettraient de marquer la transition ou l'équilibre des deux distributions.

La photoporation est compatible avec différentes lignées cellulaires (MCF7, MDA, SUM, MCF10A non présentées et non quantifiées) montrant son intérêt dans les problématiques de recherches du groupe et sa versatilité en terme de types cellulaires adhérents. Il est évident que les fractions positives et les taux de viabilité très intéressants sont les points forts de cette technique de transfection. Néanmoins deux limitations à ce protocole sont à mentionner. La première concerne le contact entre cellule et nanoparticule qui peut s'avérer létal pour certaines lignées cellulaires et rédhibitoire pour d'éventuels protocoles aboutissant à une ré-injection *in-vivo* des cellules photoporées. L'ambition de ce projet est de réaliser la séparation des nanoparticules et des cellules à traiter de façon à récolter un échantillon viable sans corps étranger. La deuxième limitation concerne la taille des échantillons traités limitée par le support de culture (boîte de culture).

La génération de nano-bulles de vapeur par irradiation de nanoparticules d'or est démontrée selon les critères de fluence et de fluorescence. Les ondes et contraintes émises par ces cavités sont propagatives. Ces phénomènes peuvent être exploités pour s'affranchir de la pré-incubation. Le chapitre suivant introduit un outil microfluidique dans le montage expérimental. Ce dernier sert à la mise en flux de la méthode de photoporation par l'intermédiaire de nanoparticules avec le renouvellement de l'échantillon pendant le traitement mais aussi sans étape de pré-incubation des cellules avec la suspension de nanoparticules.

CHAPITRE 3

PHOTOPORATION EN FLUX : SUSPENSION DE CELLULES AVEC NANOPARTICULES

Préambule :

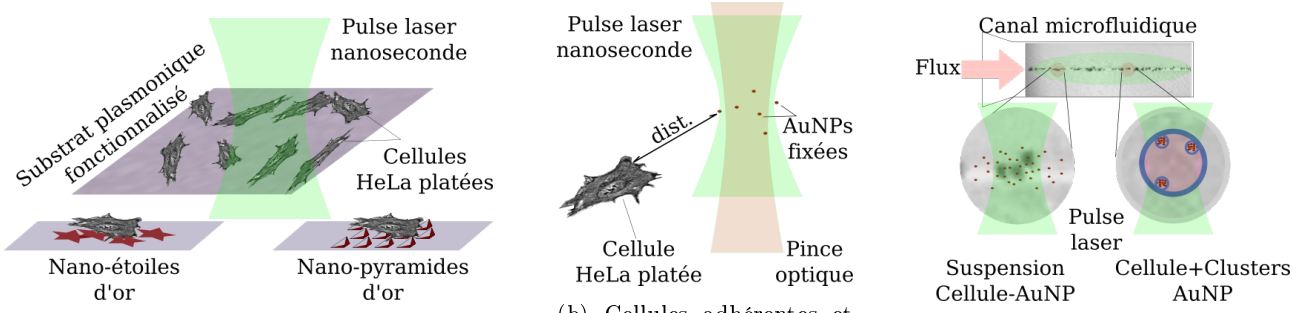
Les taux de transfection et de viabilité sont les points forts de la photoporation par intermédiaires plasmoniques sur des cellules adhérentes. Néanmoins, deux limitations à ce protocole sont à mentionner. La première concerne le contact entre cellule et nanoparticule qui peut s'avérer létal pour certaines lignées cellulaires et rédhibitoire pour d'éventuels protocoles aboutissant à une ré-injection in vivo des cellules photoporées. L'ambition de ce projet est de réaliser la séparation des nanoparticules et des cellules à traiter de façon à récolter un échantillon viable, sans corps étranger. La deuxième limitation concerne le nombre de cellules traitées, limité par le support de culture (boîte de culture).

Ce chapitre décrit un protocole de photoporation en flux appliqué au montage optique, introduit avec la photoporation de cellules adhérentes (cf Chapitre 2). La génération de nano-bulles pour la photoporation de cellules adhérentes permet de définir un seuil de fluence pour pouvoir réaliser une perméabilisation de cellules, sans nécessité de pré-incubation avec des nanoparticules. La fraction positive et la fluorescence moyenne en fonction de la fluence ont en effet confirmé la génération de nano-bulles, mais ne donnent cependant pas d'information sur la portée des ondes acoustiques générées ou les contraintes mécaniques développées.

Une première approche dans la séparation des cellules et nanoparticules d'or est de ne pas favoriser l'adsorption, en éliminant l'étape de pré-incubation. Les nanoparticules sont ajoutées à une suspension de cellules et l'échantillon est injectée dans une puce microfluidique, où se fait la photoporation avec un laser nanoseconde. En utilisant la même lignée cellulaire HeLa, la préparation d'échantillon est adaptée et les concentrations de FITC-Dextran sont maintenues. Les paramètres étudiés pour optimiser les performances de photoporation sont le nombre d'impulsions lasers et la concentration de nanoparticules.

Ce protocole "intermédiaire" valide le montage opto-fluidique et permet de poser les bases pour la photoporation en flux à distance (séparation des cellules et des nanoparticules).

1 Photoporation en flux de suspension cellules-nanoparticules



(a) Cellules en culture sur substrat

(b) Cellules adhérentes et AuNP fixées

(c) Cellules et AuNP en écoulement

FIGURE 3.1 – **Approches de la photoporation avec séparation.**
Fig.a) Des cellules sont cultivées sur des substrats fonctionnalisés avec des nanostructures plasmoniques (étoiles, pyramides, piliers...). Le système est irradié et les cellules remises en suspension. Le nombre de cellules traitées dépend de la surface. Même si le système est réutilisable, le changement de nanostructures (type, densité...) nécessite des étapes complexes (microfabrication, synthèse). **Fig.b)** Des nanoparticules d'or (AuNP) sont positionnées à l'aide d'une pince optique (laser continu dans l'infrarouge) à une distance contrôlée de la membrane cellulaire. La perméabilisation se fait avec la propagation des effets mécaniques dans le liquide. Le type de nanoparticules peut être modifié mais le traitement est local (dizaines de cellules par impulsion). **Fig.c)** La photoporation en flux peut se faire avec une étape de pré-incubation où se produit l'adsorption de nanoparticules ou l'endocytose de "clusters" de nanoparticules. Le nombre de nanostructures est contrôlé mais les débris (dans le cas des clusters intracellulaires) peuvent être incorporés par la cellule après l'impulsion laser. En injectant une suspension de cellules et de nanoparticules, les membranes cellulaires restent à proximité des sources des ondes de chocs et le tout est renouvelé constamment, sans étape de pré-incubation. Le traitement se fait alors en continu et il devient simple de constituer un échantillon photoporé qu'il est possible de filtrer pour éliminer les nanoparticules résiduelles. Dans ce cas, la distance entre cellules et nanoparticules n'est pas connue et le contact n'est pas exclu.

La photoporation de cellules adhérentes (cf Chapitre 2) permet d'obtenir des taux de transfection et de viabilité élevés ($\sim 90\%$). Elle offre aussi la possibilité de moduler la taille des nanopores créés avec l'intensité du laser d'excitation des nanoparticules [71]. Cependant, elle nécessite la pré-incubation des cellules ciblées avec une suspension de nanoparticules. Ce contact avec des éléments pouvant être cytotoxiques (nanoparticules ou leurs débris après excitation) reste un élément limitant dans des applications comme l'injection de cellules photoporées *in vivo*. Différentes approches existent pour séparer les nanoparticules des cellules pour la photoporation.

La séparation cellules et nanoparticules

Dans le cas de cellules adhérentes, une technique développée consiste à exciter un réseau de nanostructures plasmoniques (des "nano-étoiles en or") adsorbées sur un substrat (verre) [108]. Les cellules sont cultivées sur ce support et remises en suspension après photoporation par un laser continu. Dans cette configuration, la contribution plasmonique à la perméabilisation des membranes cellulaires se fait thermiquement et n'engendre pas d'altération des nanostructures. À l'aide d'impulsions nanosecondes, la même stratégie est adoptée avec des "nano-pyramides" en se plaçant en deçà du seuil de fluence critique pour l'intégrité des nanostructures (endommagement) [109]. Ici, la perméabilisation se fait par génération de nano-bulles. Les deux méthodes résultent en des taux de transfection comparables à ceux obtenus par la photoporation par nanoparticules de cellules adhérentes (respectivement $\sim 90\%$ et $\sim 80\%$) mais pour des concentrations en FITC-Dextran 10 kDa $\geqslant 10$ fois plus importantes (fig.3.1a).

Les nanostructures n'étant pas altérées, les cellules remises en suspension (traitement par Trypsine/EDTA) après traitement laser ne contiennent alors pas de traces d'or (nanoparticule ou débris) et le support plasmo-

nique peut être réutilisé ultérieurement. Cependant, la fabrication de ces substrats, la modulation des densités de nanostructures (par conséquent le nombre de nanopores [110]) et leurs répartitions se font *via* des étapes complexes (synthèse chimique ou microfabrication). Cela en fait des dispositifs très peu versatiles. Une autre configuration statique s'applique à des cellules adhérentes en fixant des nanoparticules au voisinage de cellules à l'aide de pinces optiques (fig.3.1b) [83]. Les nanoparticules sont placées, en contrôlant la distance avec les cellules, et excitées par une impulsion nanoseconde pour générer des nano-bulles de vapeur. Malgré la séparation de quelques dizaines de micromètres, le taux de transfection obtenu est de l'ordre de $\sim 75\%$ pour un traitement de dizaine de cellules par dizaines de cellules (rendement faible) [111].

Des impulsions laser plus courtes ($\sim$ 100 fs) permettent de s'affranchir de l'usage des intermédiaires plasmoniques pour photoporer des cellules adhérentes [74]. La membrane cellulaire est ciblée précisément en focalisant un faisceau laser fs à son voisinage. La sensibilité de la position de focalisation du faisceau laser par rapport à la membrane nécessite un grande précision et limite le rendement dans le temps. Cette technique a été adaptée à une puce microfluidique réalisant une focalisation hydrodynamique [149]. La contrainte de position des cellules entraîne un taux de transfection $\sim 42\%$ pour une fréquence de $\sim$ 1 cell./s. L'utilisation d'un faisceau de Bessel avec une géométrie microfluidique adaptée permet de résoudre la variabilité de fluence et de moduler le temps d'exposition au laser de photoporation [75]. Mais l'énergie nécessaire pour atteindre le seuil de photoporation est élevée. L'irradiation de toute la cellule avec de telles valeurs peut engendrer des endommagements irréparables de membranes ou de l'ADN [56].

Les nanoparticules plasmoniques permettent de réduire le seuil de fluence nécessaire à la perméabilisation des membranes pour améliorer la viabilité. Les stratégies de substrats plasmoniques ou de nanoparticules piégées sont limitées en terme de fréquence d'événements, puisque l'échantillon destiné à être photoporé n'est pas renouvelé rapidement. En couplant nanoparticules et microfluidique, une solution a été développé permettant de traiter des cellules en flux, pré-incubées avec des "clusters" de nanoparticules et ensuite remises en suspension (fig.3.1c) [112]. Le traitement par une impulsion laser de durée 70 ps avec un taux de répétition de 40 Hz permet d'atteindre des efficacités de transfection de $\geqslant 90\%$ en utilisant une solution à 2 mg/ml de FITC-Dextran 10 kDa, grâce à la génération de nano-bulles de vapeur. Les clusters de nanoparticules intracellulaires sont proches de la membrane mais l'impulsion laser peut causer leur altération (fusion, fragmentation) et générer des débris à l'intérieur du cytoplasme [150].

La versatilité de l'approche opto-fluidique est intéressante car il n'y a pas de limitation sur l'échantillon biologique. Le dispositif est capable d'accueillir des cellules en suspension ou adhérentes après remise en suspension. La mise en flux, contrairement au support de culture, renouvelle la population de cellules à traiter sans étapes intermédiaires. Seul le taux de répétition du laser (dans le cas d'une irradiation par impulsion) fixe les débits d'écoulement et par conséquent la fréquence des événements (nombre de cellules traitées par unité de temps).

Les effets mécaniques des nano-bulles de vapeur générées ont une portée non nulle [83, 107]. Par conséquent, il n'est pas nécessaire de mettre strictement en contact cellules et nanostructures plasmoniques. L'utilisation de nanoparticules en suspension autour de cellules en flux au lieu de nanostructures en substrats permet le changement de type d'intermédiaire plasmonique ou leur renouvellement avec l'échantillon après irradiation laser (fig.3.1c). Sans l'étape de pré-incubation, l'adsorption se fait sans sélectivité et ne permet qu'une estimation du nombre de nanoparticules au voisinage d'une cellule pendant l'écoulement. Cependant, cela simplifie la préparation de l'échantillon en amont et ne favorise pas l'incorporation de débris de nanoparticules.

La mise en flux de l'échantillon en microfluidique

L'usage de la microfluidique est motivé par des rendements (fréquence d'événements) et des performances (stabilité d'écoulement) élevés [114]. Le comportement laminaire des fluides, caractérisant l'écoulement microfluidique, est possible à bas nombre de Reynolds (Re compare les effets inertiels aux effets visqueux). Pour des $Re \ll 1$ théoriques, les effets inertiels sont négligeables (régime de Stokes) et les éventuelles instabilités sont atténuées. Ce comportement laminaire persiste pour des valeurs de Reynolds supérieures ($\leqslant 2000$) et crée des lignes de courant parallèles non-perturbées [115]. Par exemple, un écoulement à ~ 0.1 m/s dans un canal de dimension caractéristique ~ 100 µm a une nombre de Reynolds $Re \approx 10$.

La stabilité de l'écoulement dans ces conditions est intéressante pour des applications biologiques avec des cellules en suspension (comptage, tri) qui demandent un contrôle et une organisation du flux diphasique. L'organisation des particules (des cellules par exemple) en écoulement est primordiale pour la détection ou le traitement opto-fluidique, particulièrement si un alignement avec un laser est nécessaire, comme dans le cas de la photoporation en flux. Des géométries adaptées aux dimensions caractéristiques des cellules (canal de quelques dizaines de micromètres de large) organisent les cellules en rang mais avec un risque d'obstruction. Des techniques "actives" ont été mises au point pour réaliser plus finement un tel contrôle. L'interaction directe entre particule, comme des cellules par exemples, et champs (acoustique, optique) permet une organisation au sein de l'écoulement [116, 117]. L'introduction de certains marqueurs intermédiaires comme des particules magnétiques ou polarisables offre une sélectivité pendant la fonctionnalisation avec d'autres types de champs [151, 152].

Malgré les possibilités d'organisation, de contrôle et de sélectivité, ces techniques ont une mise en place lourde et nécessitent de l'appareillage supplémentaire (laser, transducteur, fonctionnalisation). Or, d'autres types d'interactions existent au sein d'un système microfluidique donné. Selon sa complexité (géométrie, texturisation), des effets hydrodynamiques et inertiels sont exploités pour réaliser l'organisation, la séparation ou le contrôle des particules en flux, selon le régime de l'écoulement (petit ou grand Re) [118, 119]. Pour les petites valeurs, et en terme d'organisation de particules de même type (puisqu'il n'est pas encore question de séparation), la filtration hydrodynamique est réalisée à l'aide d'un canal microfluidique droit, complété par des sorties latérales perpendiculaires successives, pour drainer des fractions de liquide tampon. Les particules se trouvent alors à une position latérale dans le canal selon leur taille (les plus petites proches des parois). L'alignement est réalisé mais la géométrie reste complexe et impose une symétrie entre les sorties latérales pour limiter les perturbations [153]. Avec des motifs géométriques répétés, comme un canal "denté" avec des extrusions/constrictions sans sorties, l'hydrophorèse exploite un gradient latéral de pression généré par la recirculation dans ces zones, où le rapport d'aspect du canal est modifié. Les forces résultantes focalisent le faisceau de particules à des positions latérales, là encore, selon la taille et la déformabilité [154].

Les petites valeurs de Reynolds limitent les débits (*i.e.* fréquence d'événements) et les dimensions caractéristiques du canal microfluidique (section). En augmentant les débits, les effets inertiels deviennent plus importants, tout en maintenant un caractère laminaire de l'écoulement. Il résulte ainsi des forces variables sur les particules en écoulement et permettent la focalisation et la séparation [155]. Dans le cas d'une géométrie droite, deux types de forces sont à considérer. Une force de cisaillement, issue du gradient de vitesse du profil décroissant de Poiseuille, qui dépend fortement du diamètre de la particule. Une deuxième force de portance résulte de la proximité avec les parois et suit le gradient croissant du profil de vitesse. Ces deux forces, de sens opposés, conduisent à une position d'équilibre dans la direction orthogonale à celle de l'écoulement et permettent l'alignement de la suspension, selon la taille des particules. Expérimentalement, pour des particules de l'ordre de ~ 10 µm dans un canal de dimension caractéristique ~ 100 µm, une focalisation complète est établie après une distance $\geqslant 1$ cm qui croît

avec le nombre Re de l'écoulement et dépend du rapport d'aspect de la section du canal [156, 157]. L'usage d'une géométrie curviligne rajoute une composante centrifuge qui réduit cette distance d'établissement à ≈ 3 mm [157].

Les techniques inertielles ci-dessus sont réputées simples à mettre en place, puisque la géométrie du système microfluidique permet l'introduction des forces d'intérêt. Même si les géométries sont facilement réalisables par micro-fabrication, elles restent néanmoins très spécifiques. En effet, la distance d'établissement du régime de focalisation étant de l'ordre du centimètre, ces techniques introduisent par ailleurs des contraintes en terme de débit (par exemple en comparaison avec le taux de répétition du laser de photoporation) et en terme de dimensions de canaux (rapport d'aspect). Une autre approche est très couramment utilisée dans des applications du type laboratoire-sur-puce ou compteur cellulaire. En introduisant des liquides latéraux dits de gaine, le liquide central subit une focalisation hydrodynamique. La largeur du "flux" central peut alors être modulée en temps réel et à géométrie fixée. En modifiant indépendamment les débits des flux latéraux, le positionnement et la focalisation du flux central peuvent être dissymétriques selon l'application et occuper une zone à faible variabilité de vitesse sur le profil de Poiseuille [114]. Un autre avantage est la large gamme de Re à laquelle opèrent ces géométries dans le régime laminaire. Cela permet de moduler la vitesse selon les contraintes de l'application. En biologie par exemple, des contraintes de cisaillement s'appliquent aux cellules en l'écoulement [120, 121]. Qu'elle soit en $2D$ (dans le plan tangent à l'écoulement) ou $3D$ (dans les deux plans tangent et normal), la focalisation hydrodynamique s'applique avec des vitesses typiques de la cytométrie en flux ($\sim 1 - 10$ m/s) dans des géométries microfluidiques simple à reproduire en microfabrication [121, 122].

En se basant sur la focalisation hydrodynamique, un protocole de photoporation en flux est développé en utilisant des cellules adhérentes remises en suspension. La focalisation réalise l'alignement de la suspension pour être en adéquation avec la géométrie du faisceau laser de photoporation elliptique, utilisé pour la photoporation de cellules adhérentes. Les débits sont alors adaptés au taux de répétition du laser et au nombre d'impulsions que l'on souhaite appliquer à l'échantillon en écoulement. Une étude systématique de ces paramètres opto-fluidiques et des concentrations des nanoparticules a permis d'optimiser les performances de la photoporation sans contact, en terme de fraction positive et de viabilité cellulaire.

2 Matériels et Méthodes : Approche opto-fluidique pour la photoporation en flux

La lignée cellulaire (cellules HeLa), la fluence laser (~ 2.6 J/cm^2), la molécule exogène (FITC-Dextran 10 kDa à 2 mg/ml) et le type de nanoparticules sont maintenus par rapport au protocole de photoporation de cellules adhérentes (cf Chapitre 2). Les résultats de la photoporation en flux sont par conséquent comparés à ceux obtenus dans la configuration "statique". Le développement de ce protocole permet la validation du dispositif opto-fluidique pour la perméabilisation par génération de nano-bulles de vapeur en flux. La variation de la concentration de nanoparticules et le nombre d'impulsions appliqué a pour but d'étudier l'influence du nombre de nanopores créés sur la performances de photoporation.

2.1 Préparation de l'échantillon biologique

Les cellules HeLa WT adhérentes sont maintenues en culture (image **a** de la fig.3.2**(i)**) dans des flasques 75 cm^2 (T75) dans 10 ml de milieu complet à base de milieu Eagle modifié de Dulbecco contenant 4.5 g/l de glucose, L-glutamine, pénicilline-streptomycine et du sérum foetal de veau DMEM(+ + +). Pour remettre des cellules adhérentes en suspension (image **b** de la fig.3.2**(i)**), les flasques sont traitées avec 1 ml d'une solution de Trypsine/EDTA à 37 °C pendant 5 min. Après ce délai, 9 ml de DMEM(+ + +) sont rajoutés pour neutraliser le réactif. Des cycles aspiration/refoulement à l'aide d'une pipette sont appliqués à la suspension pour dissocier les cellules. Pour limiter la formation d'agrégats cellulaires pendant le protocole en flux, il faut éliminer les ions calcium et magnésium et le sérum fœtal bovin. La suspension est ainsi centrifugée à 500 rpm pendant 3 min pour éliminer le surnageant et le remplacer par du tampon phosphate salin sans calcium ni magnésium (DPBS(- - -)). Le culot de cellules est alors remis en suspension dans 4 ml de tampon. C'est la solution mère (tube **0** de la fig.3.2**(i)**). 10 µl de cette dernière sont utilisés avec un compteur cellulaire automatisé afin d'estimer le nombre de cellules attendu par échantillon et par unité de temps pendant le traitement opto-fluidique.

Un volume de 3.5 ml de la solution mère est transféré dans le réservoir microfluidique (tube **1** de la fig.3.2**(ii)**) contenant 500 µl d'une solution de DPBS(- - -) avec $8 \cdot 10^7$ part./ml. Après aspiration/refoulement, le réservoir est connecté à l'appareillage microfluidique à l'entrée et mis sous agitation modérée. La suspension de cellules-nanoparticules est injectée sans contenir du FITC-Dextran. En effet, les cellules sont soumises à une agitation et restent dans le réservoir pour une durée prolongée ($\approx 1-2$h selon expérience). Il n'est pas à exclure, qu'en présence de FITC-Dextran dans la suspension, une incorporation passive dans le réservoir ou dans les tubulures d'acheminement jusqu'à la puce se produise. Or, les fluctuations de concentrations de FITC-Dextran ambiant n'ont pas de conséquences sur le signal en fluorescence des cellules adhérentes photoporées (résultat du Chapitre 2). L'exomolécule n'est donc en solution que dans les autres flux porteurs (latéraux et central) à la concentration nominale dans du tampon phosphate salin sans calcium ni magnésium à 4.5 g/l de glucose DPBS(- - +) (tubes **2** de la fig.3.2**(ii)**). De cette manière, en amont de l'irradiation, les contributions d'incorporations parasites au signal de fluorescence sont réduites. Avec l'ajout de glucose, les cellules traitées sont récoltées en aval avec un milieu contenant un minimum de nutriments.

2.2 Dispositif opto-fluidique pour la photoporation en flux

Le dispositif opto-fluidique est constitué du banc optique présenté dans le Chapitre 2 dans la même configuration optique pour générer des nano-bulles de vapeur dans les conditions de fluence au niveau de l'échantillon. Il est complété par une puce microfluidique où l'échantillon mis en suspension y est traité par un laser Q-switch. Cette dernière achemine l'échantillon (suspension cellules-nanoparticules) et le renouvelle pendant le traitement

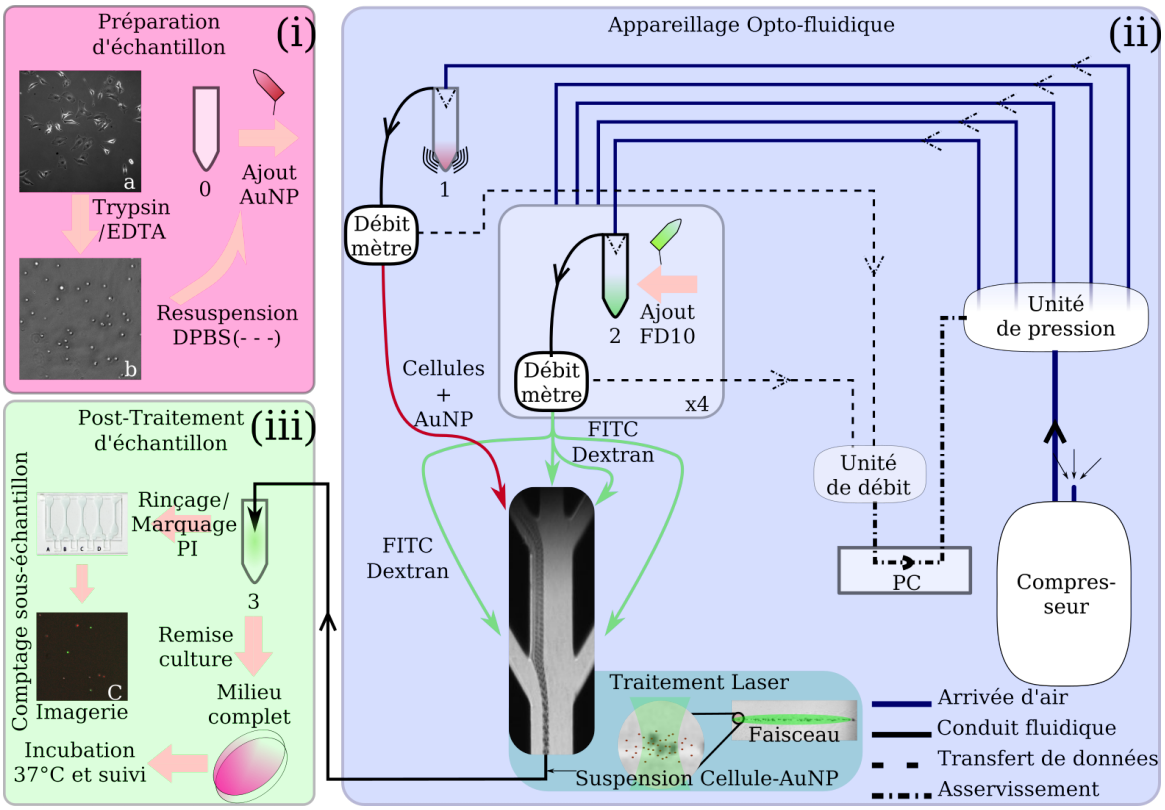


FIGURE 3.2 – **Protocole de photoporation en flux de suspension.**
(i) Préparation de l'échantillon : Des cellules HeLa WT adhérentes en culture (image **a**) dans des flasques 75 cm^2 sont traîtées avec de la Trypsine/EDTA à 37 °C. Elles sont resuspendues dans du milieu complet (DMEM(+ + +)) pour neutraliser la Trypsine (image **b**), centrifugées pour être resuspendues dans du DPBS(- - -) dans le tube **0** (solution mère) pour ne pas favoriser les liaisons cellules et la création d'agrégats. Avant transfert dans le réservoir dédié de la puce microfluidique, une suspension de nanoparticules est ajoutée à la solution mère. Le tube 0 est transféré dans le tube **1** après trituration. Ce dernier est connecté aux tubulures et mis sous agitation modérée pour éviter la sédimentation.**(ii) Appareillage microfluidique :** Les tubes **1** contenant les cellules et **2** (4 tubes) contenant du FITC-dextran en solution dans du DPBS(- - +) sont reliés à la puce avec des tubulures *via* des débit-mètres. Les solutions sont mises en flux par différentiel de pression créé par l'unité de pression alimentée par un compresseur. Cette unité est en communication avec les débit-mètres pour réguler la pression et réaliser un contrôle en débit. **(iii) Post-traitement de l'échantillon :** Après le passage dans la puce et le traitement laser, l'échantillon est récupéré dans le tube **3** pour être centrifugé 2 fois et rincé avec du DPBS(- - -) en laissant un culot de $\approx$ 100 µl. Un sous-échantillon du culot sera visualisé dans des chambres de comptage (image **c**) et le reste replaté en boîte de culture à fond de verre. L'imagerie concernera le canal FITC pour l'incorporation de l'exomolécule (vert) et le canal Iodure de Propidium (PI) avec lequel l'échantillon a été marqué après centrifugation pour évaluer la létalité de la photoporation (rouge).

de photoporation. Elle a également la fonction d'organiser l'écoulement de la suspension en adéquation avec la géométrie du faisceau laser elliptique. La suspension est ainsi confinée dans la direction perpendiculaire à l'écoulement (petit axe du faisceau) par focalisation hydrodynamique.

2.2.1 Focalisation hydrodynamique en puce microfluidique

La géométrie de base des puces microfluidiques utilisées est une géométrie de focalisation hydrodynamique qui consiste en une entrée centrale et des entrées latérales symétriques. Les puces sont fabriquées à partir d'un assemblage verre-silicium-verre en salle blanche (fig.3.3). Le choix de ces matériaux permet la tenue aux hautes pressions (fréquentes pendant les nettoyages) et une très bonne transparence optique dans le visible. La micro-fabrication commence par un nettoyage de deux wafers au plasma O_2 : le premier en silicium faisant 3 pouces

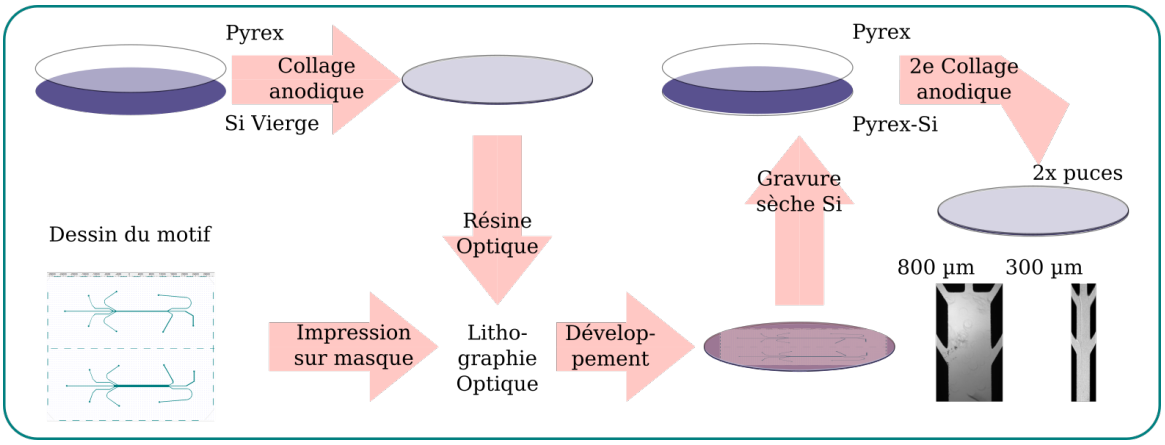


FIGURE 3.3 – **Processus de Microfabrication de puce microfluidique.**
Les wafers de Si et de Pyrex® sont nettoyés pour être collés avec la méthode anodique à haute température. De la résine photosensible est ensuite déposée pour être lithographiée par insolation UV et développée. L'échantillon est alors gravé selon un procédé Bosch de gravure sèche qui va enlever le Si aux endroit où la résine a été enlevée pendant le développement jusqu'au Pyrex®. Après avoir gravé les canaux, des trous traversants sont effectués avec un laser nanoseconde. Pour sceller la puce, un deuxième collage anodique est réalisé entre le substrat gravé et un wafer en Pyrex®. Le masque utilisé ici contient deux géométries de puce basées sur la focalisation hydrodynamique avec deux paires d'entrées latérales. Avec l'ajout des connectiques, la fabrication d'une puce s'étend sur 4-5 jours (plus de détails fig.D.1 en annexe D).

de diamètres et 100 µm d'épaisseur et le second en Pyrex® de même diamètre et faisant 1 mm d'épaisseur. Ces deux wafers sont ainsi mis en contact et soumis à un collage anodique : à haute température, une différence de potentiel (≈ 1.2 kV) est appliquée entre une électrode et le silicium en plaçant le Pyrex® (isolant diélectrique) entre les deux. Une migration de charge se fait alors à la surface des deux wafers créant des couches d'oxyde et se produit une soudure (descriptif fig.D.2 en annexe D).

Après le collage, une résine photosensible est déposée sur la face en silicium et lithographiée par insolation UV suivi d'un développement pour y graver les motifs des puces microfluidiques. Les motifs dessinés sur le logiciel CleWin sont imprimés à l'encre sur un support en plastique. En effet, les dimensions étant supérieures à ~ 10 µm, la résolution de la gravure ne nécessite pas de masque classique quartz-chrome.

Le silicium est alors gravé suivant le procédé Bosch (gravure sèche) jusqu'à atteindre le vert avec des canaux de profondeur l'épaisseur du wafer en silicium $\sim 100 \pm 20$ µm. Des trous sont réalisés à l'entrée des canaux pour connecter les canaux aux tubulures. La puce est alors nettoyée par plasma O_2 avant d'être scellée par un deuxième wafer en Pyrex® par collage anodique. Des connectiques en PTFE bio-compatible sont installées avec une colle bi-composante pour relier les tubulures microfluidiques.

La géométrie de focalisation hydrodynamique est gravée pour deux valeurs de largeur de canal principal (300 et 800 µm). Le canal principal est alimenté par une entrée centrale et 4 entrées latérales symétriques. Ces entrées sont alimentées par des réservoirs et l'écoulement généré est contrôlé en débit. Les valeurs de débits sont choisies de façon à organiser et positionner la suspension cellules-nanoparticules en écoulement. Pour que le flux porteur de cellules soit de largeur comparable à la taille des cellules, son débit est fixé à $\sim 8\%$ de la valeur des débits latéraux ($\sim 4\%$ du débit total).

2.2.2 Contrôle des débits d'écoulement

La largeur du flux porteur de cellules et la vitesse dans le canal central sont deux paramètres clefs pour la photoporation en flux. La largeur, contrôlée par la focalisation hydrodynamique et donc par les débits, doit correspondre aux dimensions du faisceau de photoporation pour garantir l'irradiation complète de l'échantillon à chaque impulsion. La vitesse de l'écoulement doit correspondre à la fréquence de répétition du laser pendant la photoporation. Elle doit également être stabilisée pour maintenir une fréquence de passage de cellules constante entre chaque échantillon. Le contrôle des débits est ainsi nécessaire pour la mesure de la fraction positive sans biais expérimental.

Les écoulements dans le puce microfluidique sont générés par un différentiel de pression à l'aide d'une unité de pression alimentée par un compresseur. Les arrivées d'air créent une surpression dans le volume libre des tubes qui génère un écoulement dans les tubulures vers les débit-mètres. Ces derniers asservissent l'unité de pression afin de contrôler les flux en débit. Une étape d'identification consistant à faire varier les pressions et à relever les débits est nécessaire pour calibrer l'équivalence pression-débit (description fig.E.2 en annexe E). Le tout se fait avec l'interface du logiciel propriétaire (fig.3.2**(ii)**). Le débit total Q_{total} est fixé selon la relation :

$$Q_{\text{total}} = \sum_{i=1}^{5} Q_i = \frac{\omega_{\text{FWHM}}}{\tau_{\text{Q-switch}}} \cdot S_{\text{chip}}/\alpha$$

où FWHM est la largeur à mi-hauteur du faisceau laser de photoporation dans la direction de l'écoulement, $\tau_{\text{Q-switch}}$ l'inverse du taux de répétition du laser $\tau_{\text{Q-switch}} = 1/f_{\text{rep}} = 100$ ms et S_{chip} l'aire d'une section droite du canal. Le coefficient $\alpha \leqslant 1$ adapte le débit au nombre d'impulsions laser désiré pendant l'irradiation.

Le montage optique est complété par une barrière optique pour le suivi temporelle de l'écoulement cellulaire. En effet, la vitesse des cellules dans la puce indique la vitesse du fluide à un débit total donné. Elle dépend de la variabilité des épaisseurs des wafer en Si. Par exemple, cette vitesse est de l'ordre de ~ 0.1 m/s pour un $\omega_{\text{FWHM}} \sim 1$ cm au centre du canal principal de la puce.

2.2.3 Adaptation du banc optique à l'écoulement cellulaire

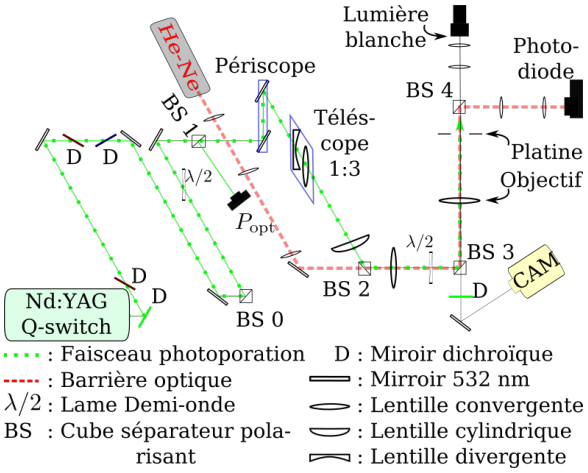
Suivi de l'écoulement avec une barrière optique

Un laser $He - Ne$ continu est focalisé au centre du canal de la puce microfluidique (fig.3.4a et b). Le faisceau transmet le passage des cellules sous forme d'extinction de signal de la photodiode. Cette dernière est reliée à un ordinateur par une carte NI™ PCIe6323 Xseries qui communique avec un instrument virtuel LabVIEW (description fig.E.1b en annexe E). Le signal est affiché en temps réel avec une fréquence d'échantillonnage de 20 kHz. Il est enregistré et analysé pour détecter les pics et mesurer la vitesse de l'écoulement et la fréquence de passage des cellules (fig.3.4c).

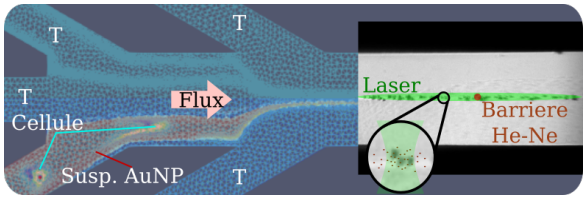
Les pics d'extinction ont une amplitude qui dépend de la taille de l'objet détecté et une largeur qui dépend de la vitesse. (fig.3.4d-i). Le signal brut acquis par la photodiode est analysé en mesurant les amplitudes et largeurs temporelles de chaque événement (fig.3.4d-ii,iii). La distribution des largeurs temporelles pour les différentes valeurs de débit (pour la modulation du nombre d'impulsions appliqué fig.3.4d-iv) traduit le fait que la focalisation n'est effectuée que dans le plan horizontal. La suspension occupe la profondeur du canal (~ 100 µm) et suit un profil de vitesse de Poiseuille (parabolique).

Photoporation en flux avec le Q-switch

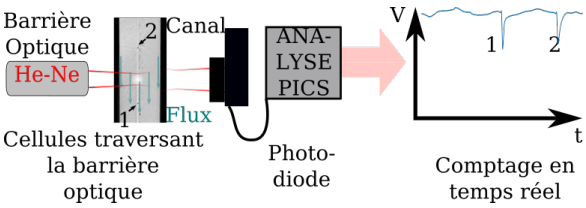
La fréquence de répétition du laser f_{rep} implique que la durée de renouvellement de l'échantillon doit être



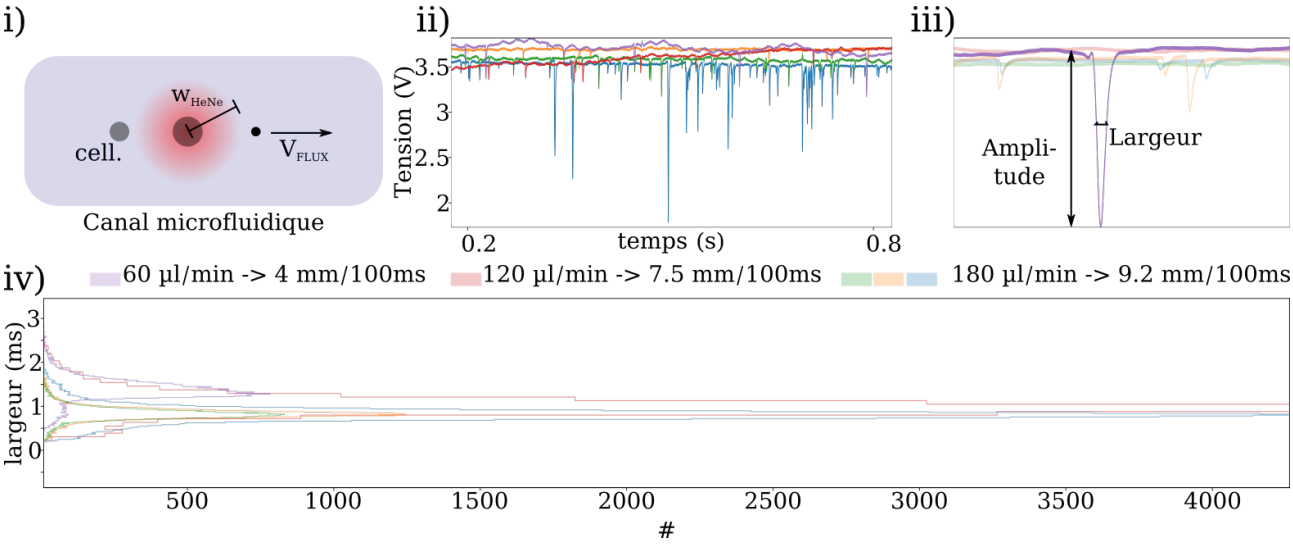
(a) Montage optique avec barrière optique



(b) Configuration à l'intérieur de la puce (sur la platine)



(c) Suivi en temps réel des cellules avec une barrière optique



(d) Mesure de la vitesse des cellules en écoulement

FIGURE 3.4 – **Montage optique pour la photoporation en flux.**
Fig.a) Un laser He – Ne est focalisé sur la trajectoire des cellules en flux. En sortie, il est renvoyé sur une photodiode enregistrant le signal en continu permettant la mesure des pics d'extinction (amplitude, largeur) et rendre de compte de l'écoulement de cellules (fréquences, tailles). **Fig.b)** Avec une géométrie réalisant une focalisation hydrodynamique, le mélange cellule-nanoparticule est acheminé jusqu'à la zone du faisceau d'excitation pour la photoporation. Les autres canaux sont porteurs de liquide tampon (ici, tampon de phosphate salin avec du FITC-dextran dissout. **Fig.c)** L'He – Ne sert à créer une barrière optique qui va être focalisée dans le canal microfluidique et le traverser jusqu'à une photodiode qui enregistra le signal avec une fréquence d'échantillonnage élevée. Le passage des cellules provoque une extinction qui est détectée et quantifiée (amplitude, largeur). Le nombre de pics détectés permet de suivre le nombre de cellules ayant traversé la puce. Leurs largeurs et amplitudes dépendent respectivement de la vitesse et la taille des objets détectés. **Fig.d)** Mesure de la vitesse de cellules en écoulement lors de la photoporation en flux (graphique *i*). En utilisant la barrière optique (waist de 29.9 ± 0.5 µm) et son signal brut (graphique *ii*), la largeur des extinctions dans le temps (graphique *iii*) donne une estimation de la vitesse de parcours des cellules. Le graphique *iv* représente les histogrammes pour 3 valeurs de débits correspondant à 1, 2 et 3 impulsions laser.

de $\tau_{\text{rep}} = 100$ ms. Les cellules doivent parcourir une distance utile d_{VNB} pendant ce laps de temps. Pour une distribution donnée d'intensité laser, la distance utile est définie par la largeur de la distribution dont l'intensité est supérieure au seuil de génération de nano-bulles. Pour des gammes de débit de l'ordre de ~ 100 µl/min dans un canal microfluidique de dimension caractéristique $\propto 100$ µm, la vitesse sera de l'ordre de $v_{\text{cell}} \propto 0.1$ m/s. En posant $d_{\text{VNB}} = v_{\text{cell}} \times \tau_{\text{rep}}$, la largeur à mi-hauteur du faisceau doit être de $d_{\text{VNB}} \propto 1$ cm.

Pour des dimensions comparables de largeur à mi-hauteur ($\propto 1$ cm), le seuil de génération de nano-bulles ($\approx 1-2$ J/cm^2) avec un faisceau circulaire est réalisable avec une puissance $P_{\text{VNB}} \propto 20$ W. Or, dans une direction du faisceau (celle qui sera orthogonale à l'écoulement), la largeur du faisceau est à convoluer avec la largeur du canal microfluidique $\propto 100$ µm. Le faisceau est alors de géométrie elliptique de dimension $\propto 10$ mm $\times 0.1$ mm afin d'atteindre le seuil de fluence pour la photoporation par nano-bulles de vapeur.

Le chemin optique pour le laser de photoporation est identique à celui mis en place pour la photoporation de cellules adhérentes (fig.3.4a). Le grand axe du faisceau elliptique est orienté au niveau de l'échantillon suivant l'axe du canal principal (direction de l'écoulement). Sur l'axe transversal, il est placé de façon à ce que la suspension cellule-nanoparticule coïncide avec le maximum d'intensité (fig.3.4b), repéré par l'excitation avec le laser Q-switch d'une solution de Rhodamine B mise en flux avant le protocole de photoporation en flux.

2.3 Photoporation en flux avec nanoparticules au voisinage des cellules

L'irradiation des cellules par le laser de photoporation se fait après établissement du régime permanent de l'écoulement cellulaire. Ce délai comprend le temps de parcours des tubulures jusqu'à la zone d'intérêt (canal central) et l'établissement d'un débit cellulaire constant. Selon le débit, l'irradiation se fait avec 1, 2 ou 3 impulsions laser et le traitement d'un échantillon et l'incorporation du FITC-Dextran se fait essentiellement dans la tubulure de sortie et le tube de récolte.

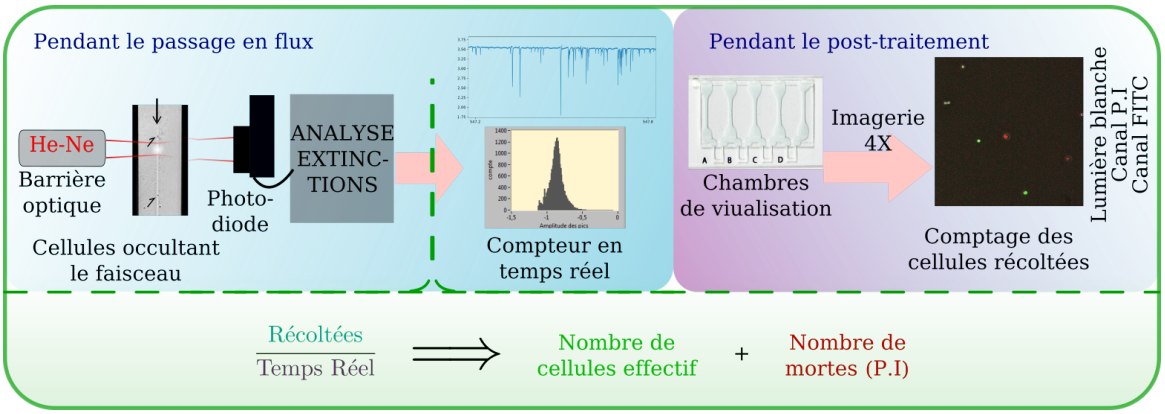
Pour chaque expérience de photoporation, des échantillons de contrôles sont produits. Le premier est un témoin de croissance issu de la solution mère : une fraction des 500 µl restants selon nombre de cellules désiré. Le second est un contrôle de la contribution du flux non irradié, appelé le contrôle flux. Enfin, le troisième, le contrôle agitation, est issu de la solution mère transférée dans le réservoir d'injection et sert également de témoin de croissance et de contrôle de la contribution de l'agitation et du post-traitement (rinçage, centrifugation). Les témoin de croissance et contrôle d'agitation sont des dilutions dans un volume final de 1 ml pour obtenir le même nombre de cellules que dans les échantillons d'intérêt.

À fréquence d'événement constante, l'extraction s'achève après la récolte d'1 ml d'échantillon. Ce volume est mis de coté quelques minutes (5-10) avant d'être dilué avec du DMEM(+ + +) (1 :10) pour diminuer le signal du FITC-Dextran exogène. Le témoin de la solution mère est remis en suspension dans 1 ml de solution de FITC-Dextran à la concentration initiale avant d'être complété par du milieu de culture pour être comparable aux échantillons d'intérêt. Enfin, le témoin de croissance globale est simplement remis en suspension dans du milieu de culture et n'est pas en contact avec l'agent fluorescent.

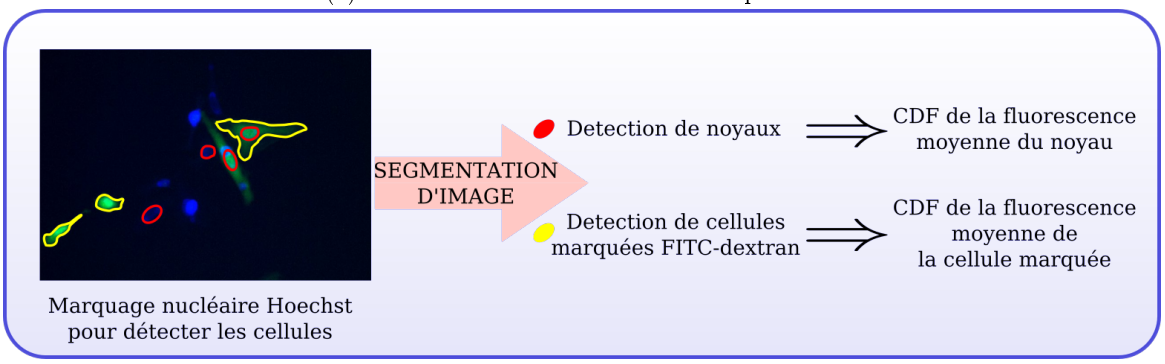
Ces échantillons sont centrifugés à 800 rpm pendant 8 min pour éliminer le FITC-Dextran non incorporé. Le surnageant est aspiré et 2 ml de DPBS(- - -) sont ajoutés avant la deuxième centrifugation (mêmes paramètres) et évacuation du surnageant (rinçage). Un culot de 100 µl est laissé après chaque rinçage (fig.3.2(**iii**)). Un marquage avec du Iodure de Propidium (P.I.) est effectué sur les culots de tous les échantillons après

30 min minimum pour éviter l'incorporation par les nanopores créés par photoporation. Cet agent intercalant de l'ADN couplé à un fluorophore (excitation par 538 nm et émission à 617 nm) révèle l'intégrité membranaire compromise des cellules et donc la mort cellulaire. Une fraction du volume ($\approx 2\%$) sera disposée dans des plaques de visualisation pour une série d'images en microscopie en fluorescence. Le reste sera remis en suspension dans 1 ml de milieu complet dans un premier temps et mis sur la partie centrale d'une boîte de culture à fond de verre de façon à concentrer les cellules dans la zone utile. Le volume restant de DMEM(+ + +) (1 ml) sera rajouté 60-90 min après la mise en incubateur.

2.4 Analyse de l'efficacité et de la viabilité de photoporation



(a) Effet du traitement sur les cellules post-flux



(b) Analyse d'images prises 24 h post-traitement

FIGURE 3.5 – **Analyse de l'efficacité et de la viabilité de la photoporation en flux.**
Fig.a) Comptage des cellules pendant l'écoulement pour comparer la sortie au nombre de cellules récoltées après l'étape de post-traitement. Ce rapport permet d'évaluer la perte de cellules (mortes) pendant le traitement laser et la centrifugation. L'imagerie se fait en prélevant ≈ 2.5 µl des 100 µl du culot après centrifugation. **Fig.b)** Analyse de la fluorescence 24 h après traitement avec l'exploitation du marquage nucléaire au Hoechst. On peut alors dégager trois métriques : le nombre de cellules, la fluorescence du noyau et la fluorescence des cellules marquées. Les échantillons en boîte de culture à fond de verre sont imagés sur ≈ 1.3 cm^2.

Après rinçage et marquage P.I. des échantillons traités en flux, une partie du culot ($\sim 2\%$) est injectée dans des chambres de 20 µm de hauteur (les cellules sont au même plan par rapport à l'objectif). En utilisant un objectif 4X, des images sont prises sur les canaux lumière blanche (comptage de la population), FITC (fraction positive) et P.I. (taux de mortalité). Connaissant les volumes injectés initialement, les dimensions de la chambre et la surface couverte par les images, le nombre de cellules est converti en une densité surfacique. Avec la remise en culture en 2 temps (1 ml de suspension cellulaire sur le disque puis 1 ml de milieu pour compléter), le reste de la suspension est concentré dans la zone à imager et le nombre obtenu peut être converti en densité surfacique

de façon cohérente avec la valeur obtenue en chambre de visualisation (voir fig.C.1 en annexe C).

Les images en lumière blanche donnent immédiatement le nombre de cellules effectivement récupérées en sortie de puce après les étapes de post-traitement. La comparaison de ce nombre avec l'estimation faite pendant le traitement en flux indique le nombre de cellules perdues entre la zone d'irradiation et la visualisation. Les images en FITC permettent d'évaluer qualitativement le nombre de cellules exprimant la fluorescence de l'agent exogène. Les cellules ne faisant que quelques pixels de diamètre et l'échantillon étant très réduit (100-200 cellules), l'intensité de fluorescence n'est mesurée que par sa moyenne. Enfin, les images en P.I. donnent une estimation des cellules dont l'intégrité membranaire est compromise, *i.e.* les cellules mortes (fig.3.5a). Puisque l'ajout de cet intercalant de l'ADN se fait après un temps d'environ $\approx 30 - 60$ min (à comparer aux dizaines de secondes de durée de vie des nanopores créés par photoporation), le signal correspond aux membranes altérées ou n'ayant pas pu être réparées après la photoporation en flux.

D'autres séries d'images sont prises avec un objectif 4x pour relever le nombre de cellules après post-traitement et leur ré-adhésion. À 24 h après le traitement de photoporation, le milieu de culture est changé pour améliorer le signal sur bruit de la fluorescence intracellulaire. Enfin, une autre série d'images est faite avec un objectif 20x $\sim$ 24 h après traitement de photoporation avec un marquage Hoechst préalable pour la détection des noyaux cellulaires. La segmentation de ces images permet d'à analyser quantitativement la fluorescence FITC-Dextran émise par les cellules photoporées (fig.3.5b) selon les standards établis pour la photoporation de cellules adhérentes (délai après remise en culture).

3 Résultats et Discussion : Photoporation en flux avec nanoparticules dissociées

Quelle que soit la concentration de nanoparticules ou le nombre d'impulsions appliquées, l'approche opto-fluidique développée ici permet une photoporation en flux sans pré-incubation des cellules avec les intermédiaires plasmoniques. Elle est applicable à des lignées cellulaires adhérentes ou en suspension avec la possibilité d'utiliser différents types de nanoparticules. En terme de nombre de cellules photoporées par unité de temps, la contrainte physique reste le taux de répétition du laser (maximum 10 Hz) qui impose une limite au débit. La performance est décrite avec les mesures de fraction positive et les différents facteurs de viabilité (croissance, survie...) introduits pour la photoporation de cellules adhérentes (cf Chapitre 2).

La condition de photoporation en flux est un passage en puce avec un canal principale de 800 µm de large en appliquant un débit total de 120 µl/min où les cellules sont ainsi irradiées par trois impulsions laser. L'échantillon à photoporer contient une suspension cellules-nanoparticules où la concentration de nanoparticules est fixée à $8 \cdot 10^7$ part./ml. La photoporation de cellules adhérentes indique que le contact des cellules avec cette concentration de nanoparticules pendant la pré-incubation ne diminue pas la viabilité. La mise en suspension de nanoparticules à cette concentration avec des celles permet *à priori* une faible cytotoxicité avant irradiation et d'avoir une distance inter-nanoparticule d'une dizaine de micromètres [158].

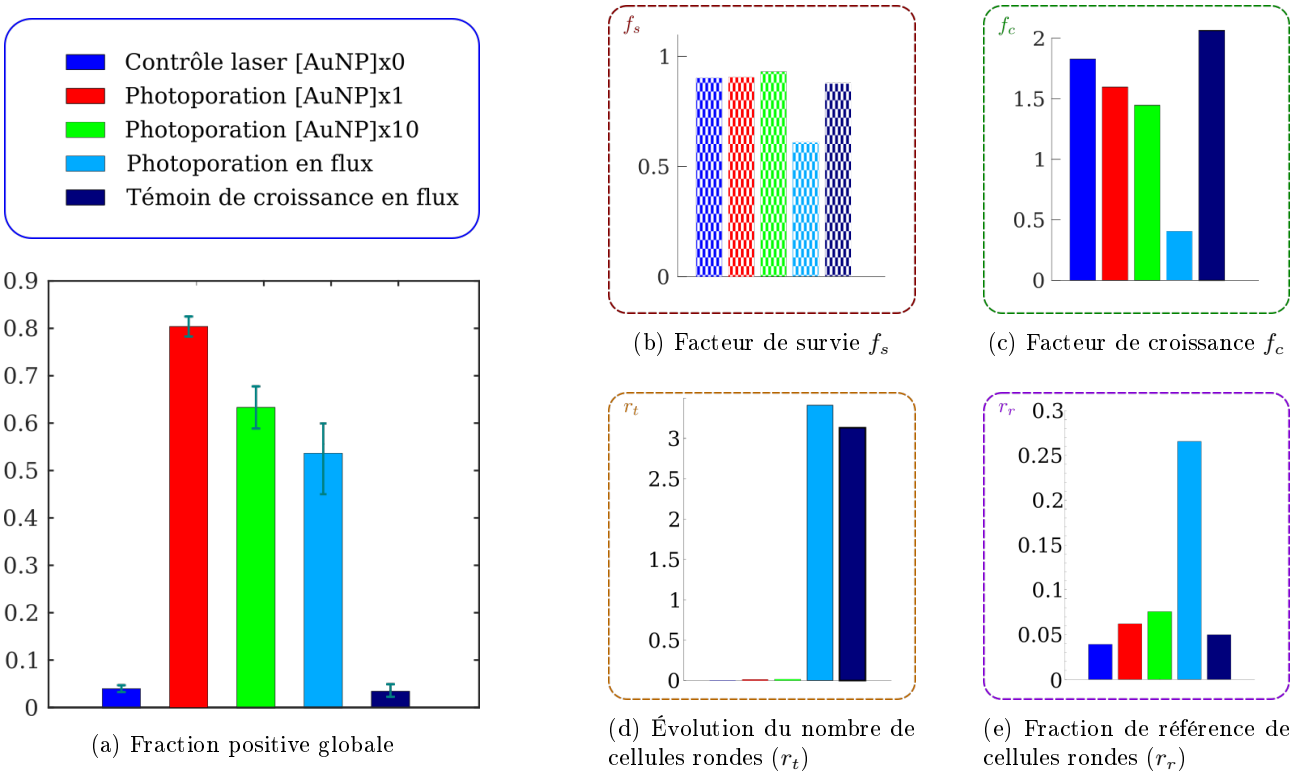
3.1 Photoporation en flux sans pré-incubation de nanoparticules

L'absence de pré-incubation de nanoparticules ne garantit pas l'adsorption des intermédiaires plasmoniques au membranes cellulaires. Contrairement à la photoporation de cellules adhérentes, le nombre de nanoparticules par cellules n'est ainsi pas calibré et leur disposition autour de la membrane n'est pas connue. L'échantillon constitué d'une suspension de cellules et de nanoparticules est donc irradié en puce microfluidique et ensuite la perméabilisation obtenue est comparé aux deux conditions de photoporation de cellules adhérentes (à concentration nominale et concentration élevée de nanoparticules, cf Chapitre 2). La viabilité est évaluée par rapport au témoin de croissance.

3.1.1 Viabilité de la photoporation en flux réduit la viabilité (description globale)

La fraction positive globale mesurée $\sim$ 24 h après photoporation en flux est de $\sim 54 \pm 7\%$ (fig.3.6a). Elle est comparable avec les valeurs trouvées dans le cas d'une photoporation thermique [56]. Or dans les conditions d'excitation optique, la perméabilisation se fait par génération de nano-bulles de vapeur. Comparé à la photoporation de cellules adhérentes, la fraction positive est moins importante que dans les conditions à ~ 8 et ~ 80 part./cell. (respectivement 83 et 63%). Pour ces deux cas, on constate que l'augmentation de la concentration qui baisse la fraction positive sans impacter la viabilité. L'hypothèse retenue est que la durée des nanopores qui est rallongée de plusieurs minutes, probablement à cause de la taille effective de ces pores (en nombre ou en rayon), entraîne ainsi la diffusion du FITC-Dextran intracellulaire après rinçage hors du cytoplasme. Comme cette mesure de la fraction positive intègre implicitement la mort cellulaire, il faut la compléter avec les facteurs de viabilité.

Le suivi de la fraction de cellules rondes est évidemment différent de celui obtenu pour la photoporation de cellules adhérentes puisque les cellules sont remises en culture après le passage en flux (fig.3.6e). La fraction de référence (à $t_{\text{réf}}$) de l'échantillon photoporé en flux est autour de $\sim 26\%$ alors que le témoin de croissance (remis en culture simultanément avec les échantillons passé en flux) contient $\leqslant 5\%$ de cellules rondes en cohérence avec



(a) Fraction positive globale

(b) Facteur de survie f_s

(c) Facteur de croissance f_c

(d) Évolution du nombre de cellules rondes (r_t)

(e) Fraction de référence de cellules rondes (r_r)

FIGURE 3.6 – **Perméabilisation par photoporation en flux : quantification globale.**
L'échantillon d'intérêt a été passé en puce Verre-Si-Verre avec un canal principal de 800 µm de large et un débit total de 120 µl/min avec une fréquence de passage de $\sim 20-50$ cell./s . La suspension cellule-nanoparticules a ainsi subit 3 impulsions laser. La photoporation en flux est comparée aux deux références de photoporation de cellules adhérentes (~ 8 et ~ 80 part./cell.). Elle est également comparée au contrôle laser de cellules adhérentes et le témoin de croissance de cellules remises en culture. **Fig.a)** Fraction positive obtenu par photoporation en flux comparé à la photoporation de cellules adhérentes. La fraction positive globale mesuré ~ 24 h après photoporation en flux est de $\sim 54 \pm 7\%$. Le contrôle laser, les photoporations de cellules adhérentes avec ~ 8 part./cell. et ~ 80 part./cell. ont respectivement des fractions positives de $4 \pm 1\%$, $80 \pm 2\%$ et $63 \pm 4\%$. La fraction obtenue en flux est plus faible malgré les conditions de générations de nano-bulles. Plusieurs éléments comme la viabilité ou la perturbation du flux pendant l'irradiation peuvent expliquer ces différences. **Fig.b)** Le facteur de survie (rapport du nombre de cellules après et avant traitement) est de $\sim 60\%$ pour l'échantillon photoporé en flux comparé au témoin de croissance en flux qui est de ~ 90 %, valeur obtenue pour la photoporation de cellules adhérentes. 40% des cellules traitées en flux ne survivent pas à la photoporation et aux étapes de post-traitement. **Fig.c)** Les facteurs de croissance (multiplication en 24 h) sont entre 1.5 et 1.7 pour la photoporation de cellules adhérentes, ~ 2 pour le témoin de croissance et ~ 0.4 pour l'échantillon photoporé. Cette valeur en dessous de l'unité implique un retard de reprise de croissance et un biais causé pour la valeur supérieure du nombre initial (attendu et mesuré pendant le traitement) lors de l'approximation par une courbe exponentielle. Les cellules n'ont à priori pas toutes adhéré depuis suffisamment longtemps pour se diviser. **Fig.d)** L'évolution temporelle du nombre de cellules rondes après le traitement est élevée pour les échantillons passés en flux puisque les cellules sont en suspension. Les deux échantillons donc comportent une majorité de cellules rondes ~ 1 h après mise en culture. **Fig.e)** La fraction de référence (densité de cellules rondes à $t \approx t^-_{\text{réf}}$) est de $\sim 26\%$ pour l'échantillon photoporé en flux en comparaison avec les fractions $\leqslant 8\%$ des échantillons pris en référence. À l'instant $t \approx t^-_{\text{réf}}$, soit près de 24 h après irradiation, il y a une forte part de cellules rondes malgré les étapes de rinçage pendant la préparation de l'échantillon post-irradiation.

les échantillons photoporés adhérents. Pour des valeurs d'évolution proches, respectivement ~ 3.4 et ~ 3.1 h^{-1}, les cellules en flux avec ou sans irradiations semblent se ré-adhérer normalement. Cependant, même après les rinçages, la photoporation en flux entraîne plus de cellules rondes donc en état de mort (fig.3.6d).

Les facteurs de croissance et de survie confirment cette tendance. Le rapport entre le nombre de cellules mesuré dans les chambre de visualisation après rinçage et celui relevé pendant le passage en puce (à $J0$) vaut $\sim 60\%$.

40% des cellules passées en flux pour le traitement ne sont plus présentes dans le culot final (fig.3.6b). De façon similaire, le facteur de croissance donne un facteur 0.4 (fig.3.6c). L'approximation des points de densité normée par une exponentielle indique que ces derniers au voisinage de t_0 (au moment du traitement) ont des valeurs supérieures à l'unité pour l'échantillon photoporé. Le nombre de cellules baisse à la fois entre la puce et la première visualisation mais également après la remise en culture. Par ailleurs, le témoin de croissance en flux présente des valeurs (à r_t près) cohérentes avec une viabilité élevée comme relevée pour la photoporation de cellules adhérentes. Par conséquent, le protocole de photoporation en flux impacte fortement la viabilité par le nombre d'impulsions, la concentration de nanoparticule ou un couplage entre les effets de l'irradiation et les contraintes fluidiques de l'écoulement.

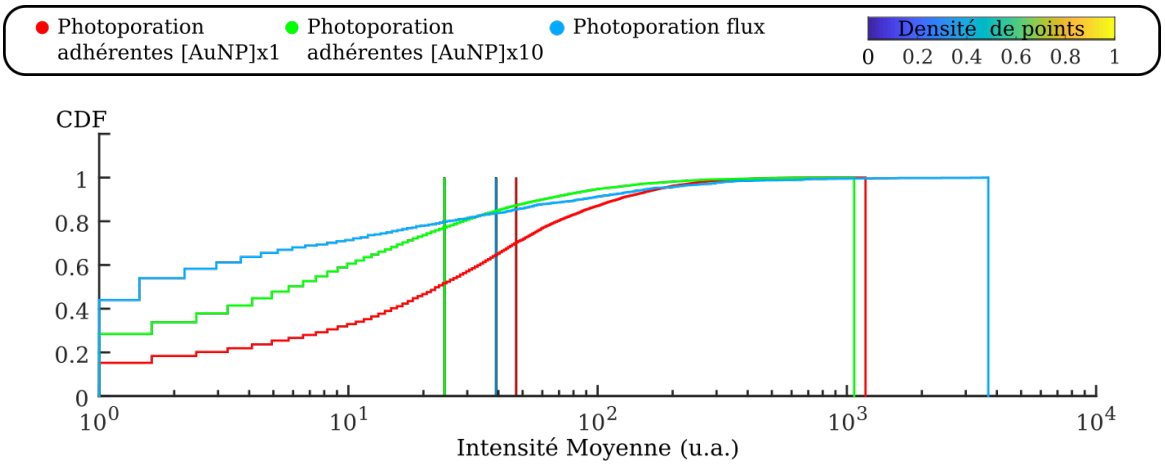
3.1.2 Génération de nano-bulles pour la photoporation en flux (fluorescence intracellulaire)

Chaque cellule détectée pendant la segmentation des images prises au 20x à $J+1$ est caractérisée par l'intensité de fluorescence moyenne et l'écart-type entre les pixels qui constituent la cellule pour les canaux Hoechst et FITC-Dextran. Le premier canal (Hoechst) peut être corrélé avec un état cellulaire apoptotique ou mitotique. Le deuxième canal permet de décrire l'efficacité d'incorporation de la macromolécule exogène pour définir le mécanisme de perméabilisation de la membrane soit photo-thermique, soit par génération de nano-bulles (fig.3.7).

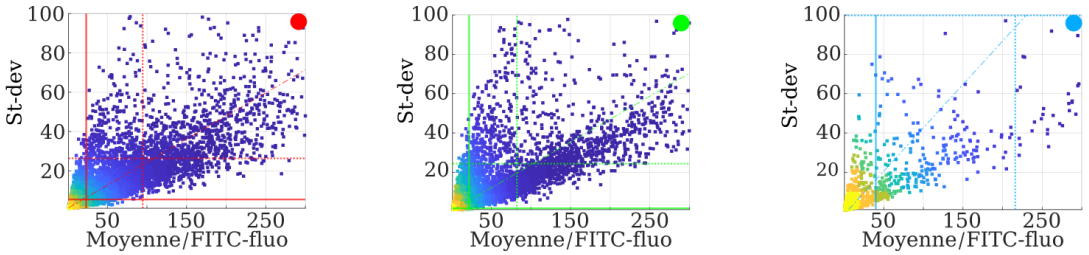
Les fluorescences moyennes intracellulaires pour les trois échantillons photoporés ($\sim$ 8 et $\sim$ 80 part./cell. en adhérentes et en flux respectivement) forment des distributions dont les moyennes sont respectivement 47, 24 et 39 u.a. (fig.3.7a). Les deux moyennes en adhérentes (47 et 24) correspondent à une incorporation de FITC-Dextran par génération de nano-bulles de vapeur. Par conséquent, la perméabilisation des membranes cellulaires en flux est réalisée suivant le même mécanisme photo-acoustique, entraînant une efficacité d'incorporation similaire à la photoporation de cellules adhérentes.

La corrélation entre écart-type et moyenne de l'intensité de fluorescence distingue la qualité d'incorporation du FITC-Dextran (fig.3.7b). Les deux échantillons à concentration de nanoparticules élevée ($\sim$ 80 part./cell. et en flux) ont des répartitions des intensités de fluorescence similaires, au nombre de cellules près, en comparaison avec les cellules adhérentes photoporées avec $\sim$ 8 part./cell.. En effet, on trouve deux "lobes" impliquant deux types de cellules photoporées : petite intensité peu uniforme et grande intensité plus uniforme. Par ailleurs, l'échantillon photoporé en flux présente une efficacité d'incorporation plus dispersée que l'échantillon adhérent (respectivement barres pointillées et code couleur) en cohérence avec la représentation des distributions de fluorescence (fig.3.7a). Une hypothèse pour cette meilleure incorporation est la contribution fluidique à la perméabilisation. En effet, les nanopores créés par les contraintes des nano-bulles de vapeur sont modifiés par les contraintes fluidiques (cisaillement dans le canal de sortie de la puce).

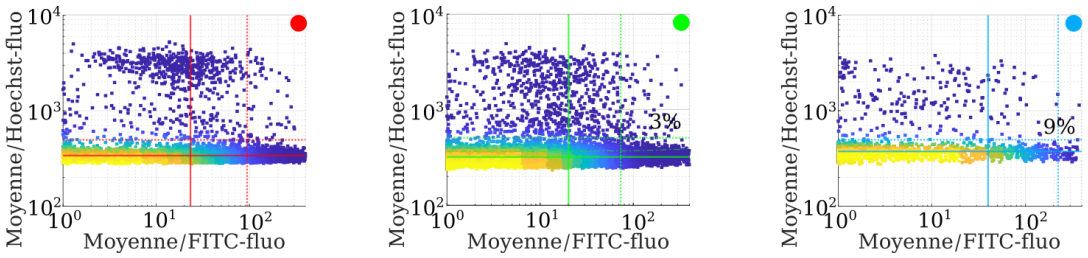
La corrélation des moyennes de fluorescence des canaux FITC-Dextran et Hoechst ne révèle pas de lien clair entre perméabilisation et perte de viabilité (fig.3.7b). D'une part, parce que la détection de ce type de cellule comporte un biais : les intensités très élevées provoquent un dilatation des zones d'intérêt (intensité supérieure à celle du seuil de détection sur une surface plus grande). Ces zones deviennent alors plus grandes que les critères géométriques appliqués pendant la segmentation d'images. D'autre part, nous avons vu que la part de cellules rondes est autour de 26% juste avant l'imagerie avec marquage Hoechst. On en conclut que le rinçage de la solution Hoechst (amélioration du rapport signal sur bruit) élimine cette population et réduit le nombre de cellules fortement fluorescentes. On peut aussi remarquer que le marquage Hoechst révèle que pour un même seuil (500 u.a.), l'échantillon adhérent a 3% de la population au dessus alors que l'échantillon en flux est à 9%.



(a) Distribution de fluorescence de cellules photoporées



(b) Diagramme FITC



(c) Diagramme FITC-Hoechst

FIGURE 3.7 – **Fluorescence FITC et Hoechst intracellulaire des cellules perméabilisées**
La distribution de fluorescence à l'échelle de l'échantillon est comparée entre trois conditions : photoporation de cellules adhérentes avec $\sim$ 8 et $\sim$ 80 part./cell. et photoporation en flux. Les diagrammes de dispersion de l'écart-type en fonction de la fluorescence moyenne pour le canal FITC ou la moyenne Hoechst en fonction de la moyenne FITC sont fournis pour la condition avec $\sim$ 80 part./cell. et la condition en flux. **Fig.a)** Distribution des fluorescences moyennes intracellulaire pour les trois conditions de photoporation. Les moyennes de ces distributions sont de 47, 24 et 39 u.a. pour $\sim$ 8 et $\sim$ 80 part./cell. en cellules adhérentes et en flux. L'incorporation du FITC-Dextran semble cohérente avec une perméabilisation par nano-bulles de vapeur. **Fig.b)** Diagramme de dispersion entre moyenne et écart-type de la fluorescence FITC pour les conditions $\sim$ 8 part./cell., $\sim$ 80 part./cell. et en flux respectivement. **Fig.c)** Diagramme de dispersion entre moyenne de la fluorescence FITC et moyenne de la fluorescence Hoechst pour les conditions $\sim$ 8 part./cell., $\sim$ 80 part./cell. et en flux respectivement.

Pour les mesures de la fluorescence dans le canal FITC, il apparaît que la perméabilisation des membranes se fait par génération de nano-bulles. La concentration de nanoparticules, le nombre d'impulsions pendant l'irradiation ou les contraintes fluidiques semblent impacter la viabilité et augmenter le nombre de cellules fortement fluorescente en Hoechst sans corrélation claire avec l'incorporation du FITC-Dextran. Cela reste cohérent avec une description globale des facteurs de viabilité.

Il est intéressant de remarquer que les fractions positives des échantillons de photoporation de cellules adhérentes sont supérieures à celles mesurées pour l'échantillon de photoporation en flux. Il y a donc moins de cellules fluorescentes. Cependant, la fluorescence moyenne de la condition en flux est intermédiaire entre les deux conditions de cellules adhérentes. Cela indique que l'efficacité d'incorporation obtenue en flux est supérieure. Il peut s'agir d'un nombre de nanopores supérieur en faveur de la photoporation en flux. Une autre explication est le mécanisme d'incorporation du FITC-Dextran dans le cytoplasme. La pré-incubation entraîne l'adsorption des nanoparticules aux membranes cellulaire dans le cas de la photoporation de cellules adhérentes. Pour des nano-bulles hémisphériques, ce qui peut être le cas ici, il n'a pas de génération de jet [159, 160]. Comme l'adsorption n'est pas favorisée en flux, on peut penser que les nanoparticules sont au voisinage de la membrane séparées d'une couche de liquide. Les nano-bulles sont formées et la cavitation aboutie à la formation d'un nano-jet car la distance de séparation est non nulle [161].

3.2 Influence du cisaillement sur la fraction positive de la photoporation en flux

La baisse de viabilité causée par la photoporation en flux est causée d'une part par la perméabilisation des membranes cellulaires et d'autre part par les éventuelles contraintes hydrodynamiques pendant l'écoulement des cellules dans la puce. La première cause est liée à deux paramètres induisant la création de nanopores : les nanoparticules et l'irradiation. Le nombre de nanoparticules par volume (nombre de sites de création de nanobulles potentiels) est modifié directement avec la concentration de la suspension de nanoparticules injectée dans le système fluidique. La deuxième source de mortalité, mais aussi de perméabilisation [46], peut être évaluée en comparant les facteurs de viabilité d'un échantillon contrôle en flux sans irradiation laser avec le témoin de croissance et le contrôle agitation.

Les contributions hydrodynamiques sont sous forme de contraintes de cisaillement dû à la variation du profil de vitesse en écoulement [162]. Cette variation est d'autant plus importante que la vitesse est élevée ou que la largeur du canal est petite. Par ailleurs, le nombre d'impulsions (nombre d'événements de création de nanobulles) est modulé par le débit total dans la puce microfluidique à taux de répétition du laser fixé (fig.3.4d). L'augmentation de la vitesse d'écoulement pour augmenter le cisaillement réduit par conséquent le nombre d'impulsions. De plus, la fréquence de répétition du laser impose une borne haute aux débits et donc à la vitesse d'écoulement. Cette limite est contournée en réduisant la largeur caractéristique de l'écoulement en utilisant une puce microfluidique de canal principal de largeur 300 µm.

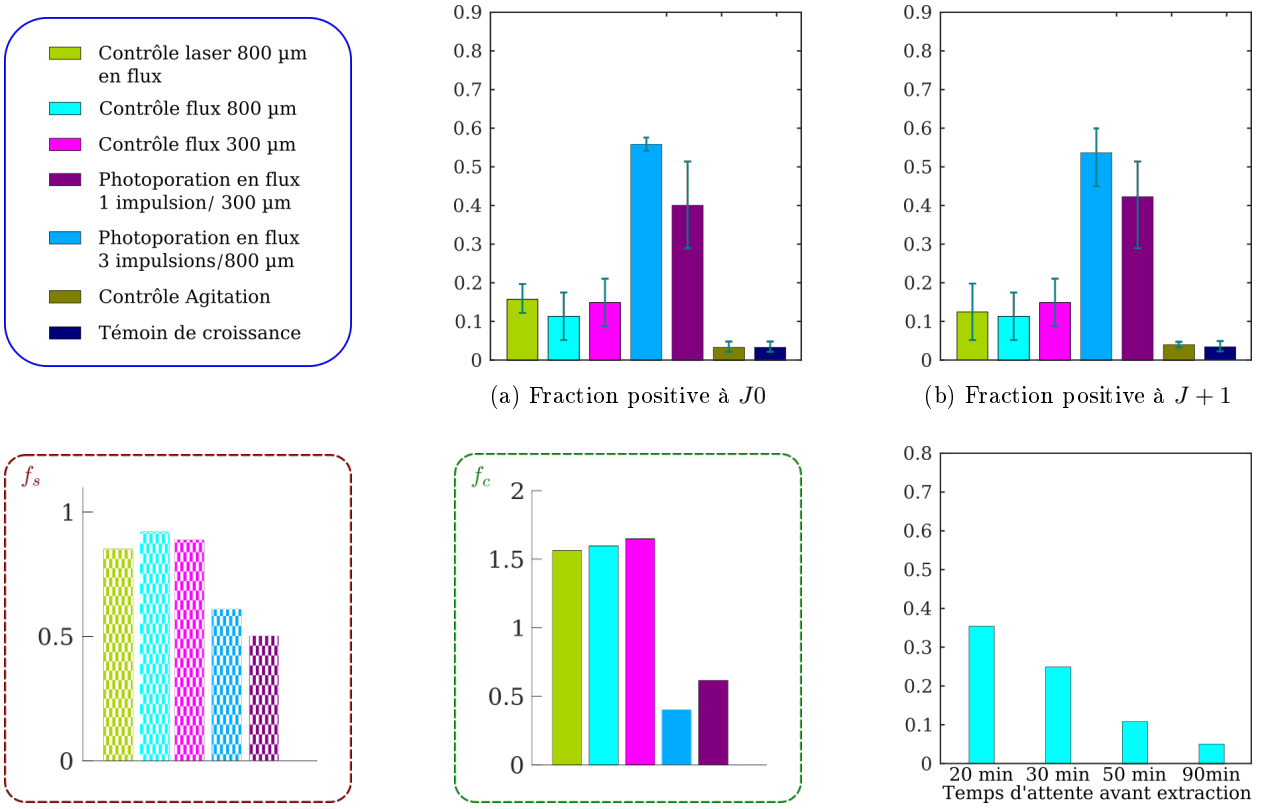
Deux échantillons photoporés, contenant une concentration de nanoparticules identique ($8 \cdot 10^7$ part./ml), respectivement en canal 800 µm avec 3 impulsions et en canal 300 µm avec une impulsion sont comparés en terme de perméabilisation et de viabilité. Les deux conditions de photoporation sont également comparées aux échantillons de contrôle flux des deux conditions fluidiques, d'agitation et de témoin de croissance. Dans un second temps, le nombre d'impulsions laser est varié dans la puce microfluidique de 300 µm de large pour déterminer son influence sur la viabilité et la perméabilisation.

3.2.1 Effet du cisaillement sur la viabilité des cellules en écoulement

Avec un facteur de survie $f_s \sim 90\%$, l'irradiation et la modification de la vitesse d'écoulement n'impacte donc pas la viabilité des cellules lors du passage en puce microfluidique (fig.3.8c). En revanche, les échantillons photoporés ont des facteurs de survie de 40% et 60% pour les conditions de photoporation avec 1 et 3 impulsions respectivement pour une concentration de nanoparticules utilisée de $8 \cdot 10^7$ part./ml.

Les facteurs de croissance des conditions non irradiées en présence de nanoparticules (contrôle laser et flux) valent ~ 1.5. La photoporation en flux présentée initialement impacte la croissance puisque f_c vaut ~ 0.4. En réduisant la concentration de nanoparticules et la largeur du canal, le facteur de croissance est égal à ~ 0.6. La croissance est ralentie mais la réduction de la perte de cellules (augmentation du facteur de survie) améliore le facteur de croissance.

Pour une concentration de nanoparticules fixée, la modification des paramètres fluidiques et d'irradiation n'améliore ni n'altère de façon significative la viabilité. Cependant, les contraintes sont différentes et peuvent impacter la fraction positive.



(a) Fraction positive à $J0$

(b) Fraction positive à $J+1$

(c) Facteur de survie f_s

(d) Facteur de croissance f_c

(e) Perméabilisation avec le contrôle flux

FIGURE 3.8 – **Perméabilisation par photoporation en flux dans deux configurations de cisaillement.** Des cellules sont photoporées respectivement dans une puce microfluidique à canal principal de largeur 800 µm et dans une puce microfluidique de largeur 300 µm. La concentration de nanoparticules reste identique mais le nombre d'impulsions pendant l'irradiation est réduit à 1. **Fig.a)** Fraction positive globale obtenue par photoporation en flux et mesuré à $J0 \sim 2$ h après irradiation. Tous les contrôles (laser, flux, croissance et agitation) ont des fractions inférieures ou égales à $\sim 15\%$. La photoporation en flux dans un canal de 800 µm renvoie une fraction de $\sim 56\%$. La diminution de la largeur de canal réduit la fraction positive à $\sim 40\%$. Les contrôles en flux enregistrent également un écart puisque la fraction obtenue dans le canal le plus large est moins important que dans l'autre (~ 16 contre $\sim 11\%$). **Fig.b)** Fraction positive globale obtenu par photoporation en flux et mesuré à $J+1 \sim 24$ h après irradiation. Les fractions restent quasi identiques entre $J0$ et $J+1$ pour tous les échantillons présentés. On peut toutefois relever que la perméabilisation faite dans le canal de 300 µm de large avec une impulsion passe à $\sim 42\%$ alors que l'échantillon irradié par trois impulsions laser dans un canal de 800 µm de large passe à $\sim 54\%$. **Fig.c)** Le facteur de survie implique que $\geqslant 87\%$ des cellules ont été récupérées après le passage en flux sans les nanoparticules, avec ou sans irradiation (conditions de contrôle). Les échantillons avec des valeurs de f_s de 40% et 60% sont photoporés avec 1 et 3 impulsions respectivement. **Fig.d)** Les facteurs de croissance (multiplication en 24 h) des conditions non irradiées en présence de nanoparticules (contrôle laser et flux) valent ~ 1.5. La photoporation en flux présentée initialement impacte la croissance puisque f_c vaut ~ 0.4. En réduisant le nombre d'impulsions laser et la largeurs du canal, le facteur de croissance est égal à ~ 0.6. La croissance est ralentie mais la réduction de la perte de cellule (augmentation du facteur de survie) améliore le facteur de croissance. **Fig.e)** Fractions positives obtenu par passage en flux dans une puce microfluidique avec une canal centrale de 800 µm de largeur en fonction du délai écoulé entre la mise en flux et le début de l'extraction. La particularité de la mise en flux sont les consignes de pression émises dès le début de l'injection pour initier la dynamique de l'écoulement cellulaire (voir la Section 2).

3.2.2 Fractions positives entre $J0$ et $J+1$

La fraction positive globale est mesuré à $J0$, ~ 2 h après la photoporation en flux (fig.3.8a). Tous les contrôles (laser, flux, croissance et agitation) ont des fractions inférieures ou égales à $\sim 15\%$. La photoporation en flux dans un canal de 800 µm donne une fraction de $\sim 56\%$. La diminution de la largeur de canal réduit la fraction

de cellules positives à $\sim 40\%$. Les contrôles flux enregistrent également un écart puisque la fraction obtenue dans le canal le plus large est plus étroit que dans l'autre (~ 16 contre $\sim 11\%$).

L'écart entre les conditions de photoporation est léger à $J0$ mais reste cohérent avec l'augmentation des contraintes fluidiques sur les cellules en écoulement dans les deux canaux (cisaillement fluide) [163]. Cela se manifeste par la baisse de viabilité observée *via* le facteur de survie f_s. La diminution de la fraction de cellules positives avec la largeur du canal est donc vraisemblablement due à la hausse des contraintes hydrodynamiques.

Les fractions positives globales obtenues par photoporation en flux et mesurées à $J + 1$, ~ 24 h après irradiation, restent quasi-identiques avec celles mesurées à $J0$ pour tous les échantillons présentés (fig.3.8b). On peut toutefois relever que la perméabilisation faite dans le canal de 300 µm avec une impulsion laser passe à $\sim 42\%$ alors que l'échantillon irradié par trois impulsions dans un canal de 800 µm passe à $\sim 54\%$. Cette variation en opposition, si elle est significative, peut être expliquée par le nombre d'impulsions puisque la largeur de canal n'influe pas sur les contrôles flux.

La largeur du canal, en comparant la viabilité, s'avère très peu influente. L'écart des fractions positives induit entre les deux échantillons photoporés est donc dû à un effet du nombre d'impulsions et potentiellement à son couplage avec la largeur du canal microfluidique et les contraintes qui en dépendent (cisaillement).

3.2.3 Perméabilisation "passive" en flux (sans irradiation)

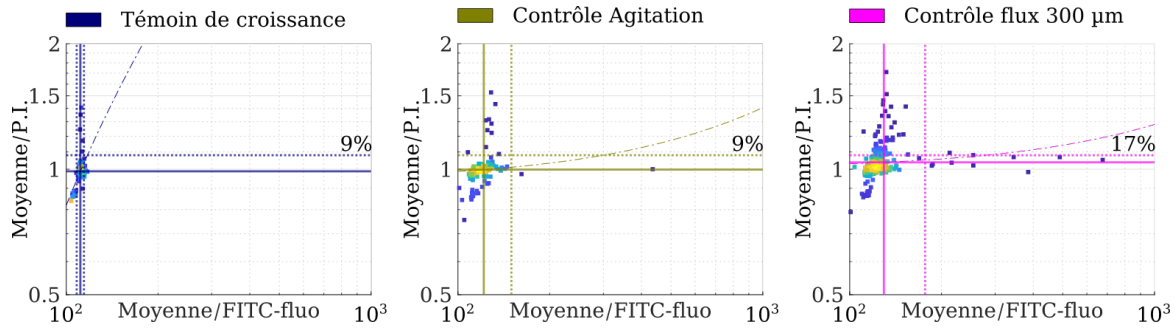
La mise en flux des suspensions à irradier nécessite un temps d'établissement dépendant du débit de consigne. Le débit-mètre utilisé est limité aux gammes de débit à 8 µl/min. Pour un débit total de 120 µl/min, le débit du flux porteur de cellules est égal à 5 µl/min. Le débit-mètre est choisi afin d'améliorer la résolution pour les flux porteurs de cellules. Le temps de parcours de la tubulure entre le réservoir et la puce et l'établissement du régime permanent de l'écoulement des cellules sont donc importants pour ces valeurs. Pour réduire le temps d'attente, la mise en flux comporte des consignes de surpression pendant les premières minutes d'écoulement pour raccourcir le temps d'établissement à ~ 10 min. Les cellules passées en flux sans irradiation constituent le contrôle flux.

Perméabilisation du contrôle flux et instant d'extraction

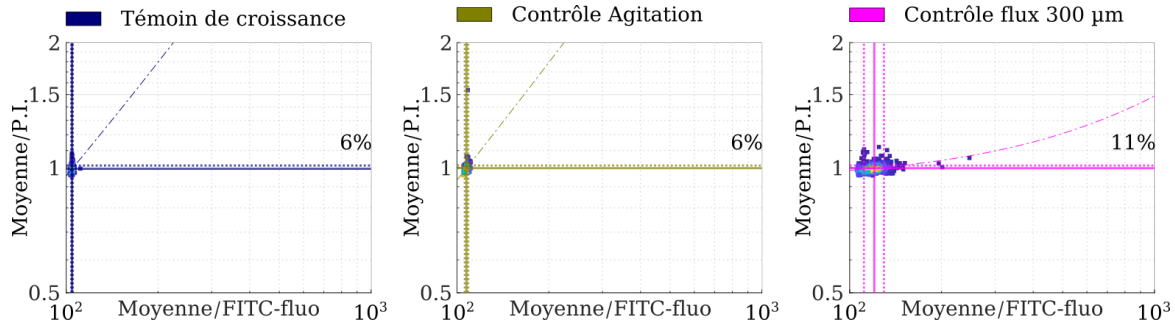
La fraction positive obtenue par passage en flux dans une puce microfluidique avec une canal principal de 800 µm de largeur est mesuré pour des échantillons recueillis à différents moments à partir de la dernière surpression (fig.3.8e). On remarque que le taux diminue en augmentant le délai écoulé entre la mise en flux et le début de l'extraction. La particularité de la mise en flux sont les consignes de pression émises dès le début de l'injection pour initier la dynamique de l'écoulement cellulaire. Les premières minutes de l'écoulement contiennent donc des cellules soumises à des vitesses environ 50 à 100 plus grandes pendant 6 s. La membrane est fragilisée et la perméabilisation est suffisante en sortie de puce pour l'incorporation du FITC-Dextran. Cette approche est exploitée dans la littérature pour la manipulation de cellules [46].

Par ailleurs, le niveau de marquage P.I. observé dans le cas de la condition du contrôle flux est comparable à ce que l'on obtient dans le cas des témoins de croissance ou d'agitation. Cela indique que la nouvelle géométrie de puce microfluidique n'altère pas la viabilité et que la source de mortalité reste l'irradiation par le laser Q-switch en présence de nanoparticules. La viabilité des conditions d'irradiation dans les deux géométries microfluidiques présentées est cependant modifiée. Cela est probablement dû au couplage des effets fluidiques

(cisaillement) et plasmoniques des nanoparticules à concentration fixée par la génération de nano-bulles ou simplement par leur présence (fig.3.8). La réduction de la concentration diminue donc les contraintes cumulées sur la membrane cellulaire et augmente les chances d'une meilleure viabilité après irradiation.



(a) Diagramme pour des échantillons [AuNP] × 1



(b) Diagramme pour des échantillons [AuNP] × 1/4

FIGURE 3.9 – **Corrélation de la fluorescence intracellulaire entre P.I. et FITC d'échantillons passés en flux en présence de nanoparticules pour deux concentrations à $J0 \sim 2$ h après extraction.** Deux échantillons sont passés en flux dans une puce microfluidique de canal central de largeur 300 µm en suspension avec des nanoparticules d'or à $8 \cdot 10^7$ part./ml ([AuNP] × 1) et $2 \cdot 10^7$ part./ml ([AuNP] × 1/4) sans irradiation par le laser Q-switch. Les valeurs de fluorescence intracellulaire du marquage P.I. ont été normalisées par rapport à la médiane (trait plein horizontal) du témoin de croissance. Les traits verticaux en pointillé indiquent la dispersion de la fluorescence FITC. Le trait horizontal en pointillé indique le seuil arbitraire pris pour mesurer le P.I. en relatif. **Fig.a)** Condition à [AuNP] × 1. Le diagramme de dispersion n'indique pas de corrélation entre mort cellulaire et incorporation de FITC-Dextran pour les échantillons non irradiés. Le contrôle flux contient 17% de cellules marquées positives (mort cellulaire) alors que les témoins de croissance et d'agitation contiennent $\sim 9\%$. **Fig.b)** [AuNP] × 1/4 Le diagramme de dispersion n'indique pas non plus de corrélation entre mort cellulaire et incorporation de FITC-Dextran pour les échantillons non irradiés à plus faible concentration de nanoparticules d'or. Le contrôle flux contient cependant 11% de cellules marquées positives et les témoins 6%. Cet écart entre les deux conditions est en partie un artefact d'imagerie (basal de fluorescence plus élevé pour la condition [AuNP] × 1). Cependant la différence entre témoin de croissance et contrôle flux est d'une part le cisaillement subi par les cellules et la présence des nanoparticules.

Viabilité des cellules en flux en présence de nanoparticules

Sans irradiation par le laser de photoporation, des échantillons sont passés en flux dans une puce microfluidique de canal central de 300 µm de large à débit total 180 µl/min (débit correspondant à une impulsion laser) en présence de FITC-Dextran. Ils sont ensuite marqués au P.I. et la fluorescence intracellulaire est quantifiée à $J0$ quelques heures après le passage en flux. Il n'y pas de corrélation entre marquage P.I. et l'incorporation du FITC-Dextran. Cela traduit qu'il n'y a pas de lien entre la perméabilisation passive et la mort cellulaire quelle que soit la concentration de nanoparticules utilisée (fig.3.9). L'absence de corrélation ne signifie pas nécessairement que la mort cellulaire est induite après le passage en flux. Le FITC-Dextran est incorporé par diffusion [164]. Le gradient de concentration et pression osmotique [85, 165] peuvent favoriser la diffusion du

FITC-Dextran hors du cytoplasme par les pores non réparés. En l'occurrence, les pores créés par le cisaillement pendant l'écoulement dans la puce microfluidique peuvent être suffisamment importants pour ne pas être réparables. En effet, un pore de 0.1-1 µm peut être réparé [107]. Dans une gamme inférieure, la perméabilisation avec des nanopores plus nombreux (70-80 par cellule) faisant 10-20 nm est viable et reste réparable par la cellule [104, 110]. Le FITC-Dextran diffusé à l'intérieur du cytoplasme peut s'en échapper par gradient de concentration pendant les étapes de rinçage parce que les pores sont trop nombreux ou trop larges. En l'absence d'irradiation, on peut supposer que le cisaillement s'applique globalement sur la membrane entraînant la création de quelques pores micrométriques.

La fraction de cellules positives au P.I. obtenue pour chaque condition reste faible. Le contrôle flux subi le plus de facteurs pouvant compromettre la viabilité (passage en flux, présence de nanoparticules, agitation pendant le protocole). Cependant, il n'entraîne que 11% et 17% pour les concentrations [AuNP] $\times 1/4$ et [AuNP] $\times 1$ respectivement. L'écart se trouve aussi entre les témoins d'agitation et de croissance. Le premier est en contact avec la suspension de nanoparticules mais le second ne subit que les étapes de post-traitement (centrifugation). Cette variation n'est pas en lien avec la concentration de nanoparticules mais est en partie un artefact d'imagerie lié à un basal de fluorescence plus élevé pour la condition [AuNP] $\times$ 1. On peut supposer que la viabilité est comparable entre les deux conditions de nanoparticules.

3.3 Réduction de la concentration d'AuNP pour la photoporation en flux

Le nombre de nanoparticules adsorbées aux membranes cellulaires est contrôlé par l'étape de pré-incubation avec la concentration initiale. Dans le cas de la photoporation en flux, l'adsorption n'est pas favorisée. Ce nombre est donc défini par unité de volume est non plus par cellule. les suspensions de cellules traitées contiennent entre ~ 0.5 et $\sim 2.6 \cdot 10^6$ cell./ml. À partir d'une concentration initiale de nanoparticules d'or de $8 \cdot 10^7$ part./ml, il y a $\sim 40 - 160$ part./cell. par volume occupé par une cellule dans l'hypothèse d'une suspension homogène.

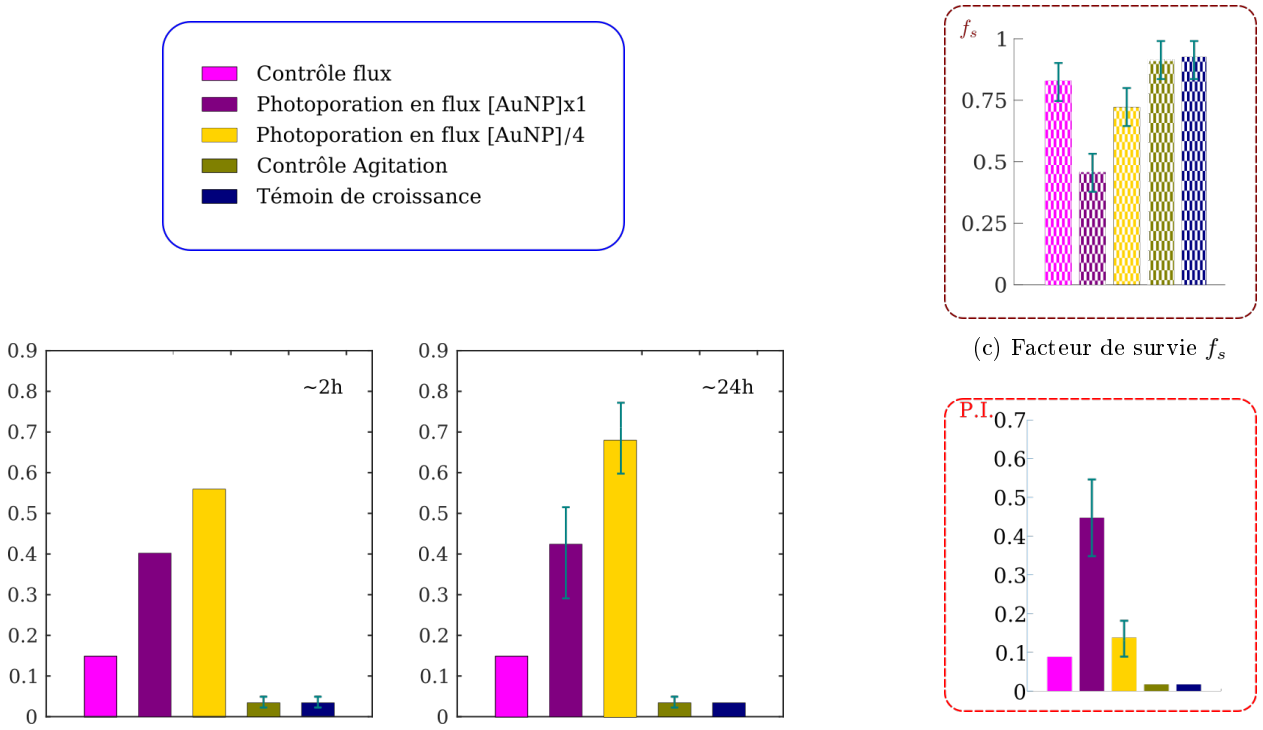
Deux échantillons sont photoporés dans les nouvelles conditions fluidiques (puce de 300 µm et 1 impulsion) en utilisant deux concentrations de nanoparticules avec la même fluence laser. La variation de ce paramètre se fait en amont du passage en flux entre le tube 0 et 1 avec l'ajout d'une suspension diluée de nanoparticules d'or (fig.3.2). Dans les expériences de photoporation de cellules adhérentes, un facteur deux sur la concentration ($\sim$ 16 part./cell.) est moins influent en comparaison avec le facteur dix ($\sim$ 80 part./cell.) en terme de fraction positive. Arbitrairement, les concentrations testées sont la concentration nominale à $8 \cdot 10^7$ part./ml et sa dilution d'un facteur quatre qui correspondent respectivement à $\sim 40 - 160$ et $\sim 10 - 40$ part./cell..

3.3.1 Diminution de la concentration de nanoparticules

La fraction positive est mesurée après l'irradiation et le rinçage (dans les chambres de visualisation) et après ré-adhésion des cellules au support de culture (fig.3.5). Qualitativement, les fractions positives des deux échantillons photoporés avec [AuNP] $\times$ 1 et [AuNP] $\times$ 1/4 et des échantillons de contrôle sont cohérents entre une mesure 2 h et une mesure 24 h post-traitement (fig.3.10a et b). Le classement des échantillons selon la fraction de cellules positives ne change pas. Cependant, ces chiffres évoluent différemment selon la concentration de nanoparticules entre $J0$ et $J+1$. L'échantillon photoporé avec [AuNP] $\times$ 1 donne $\sim (45 \pm 10)\%$ de cellules positives à la fois à $J0$ et $J+1$. L'échantillon photoporé avec [AuNP] $\times$ 1/4 indique en revanche que la fraction positive varie de 56 à $J0$ à $(69 \pm 10)\%$ à $J+1$. Le contrôle flux (sans irradiation), quant à lui, perméabilise $\sim 15\%$ de la population et donne des valeurs proches entre les deux mesures.

Les deux mesures sont prises sur des échantillons contenant entre $\sim 100 - 1000$ cellules à $J0$ en utilisant les chambres de visualisation des sous-échantillons et $\sim 9 - 15 \cdot 10^3$ cellules à $J+1$ avec l'échantillon complet. La variabilité peut s'expliquer par l'écart entre les tailles des populations. Par ailleurs, l'autre différence est l'objectif utilisé. Les fractions mesurées sont obtenues par l'imagerie des échantillons avec les objectifs 4x pour $J0$ et 20x pour $J+1$. Avec une ouverture numérique de 0.45 au lieu de 0.13 pour le 4x, le 20x permet une excitation de quantités plus petites de FITC-Dextran incorporées et élargie alors la gamme de détection vers les petites intensités. Parce que la détection d'objet se fait par seuillage du niveau d'intensité émise, une meilleure résolution obtenue avec le 20X pour les petites intensités augmente le nombre de cellule exprimant le FITC-Dextran. Contrairement à [AuNP] $\times$ 1/4, la fraction positive à [AuNP] $\times$ 1 obtenue avec une ou trois impulsions pendant l'irradiation ne fluctue pas entre $J0$ et $J+1$ (fig.3.8 et 3.12). Cela s'explique par la quantité de FITC-Dextran incorporée qui peut être plus importante à cause du nombre de nanoparticules et donc de nano-pores créés [110].

Un marquage P.I. est également effectué après le rinçage post-irradiation pour quantifier immédiatement la mort cellulaire dans les échantillons passés en flux (fig.3.10d). La dilution par un facteur un quart de la suspension de nanoparticules diminue la fraction de cellule exprimant le P.I. de $\sim$ 45 à 14% . Ces résultats rendent la viabilité comparable à la fraction obtenue avec le contrôle flux qui traduit l'effet du passage en flux sans irradiation sur la viabilité cellulaire. L'écart entre les deux échantillons irradiés est du même ordre de grandeur que celui obtenu pour la fraction positive. Ainsi, hors qualité d'incorporation, la concentration [AuNP] $\times$ 1/4



(a) Fraction positive globale à $J0$ (b) Fraction positive globale à $J+1$

(c) Facteur de survie f_s

(d) Taux de marquage P.I. (mort)

FIGURE 3.10 – **Perméabilisation par photoporation en flux avec deux concentrations de nanoparticules d'or.**
Deux échantillons d'intérêt sont photoporés dans une puce Verre-Si-Verre avec un canal principale de 300 µm de large et un débit total de 180 µl/min (1 impulsion pendant l'irradiation) contenant des suspensions de nanoparticules à deux concentration ($2 \cdot 10^7$ et $8 \cdot 10^7$ part./ml). **Fig.a)** Fraction positive globale mesuré à $J0$. Les contrôles flux, agitation et le témoin croissance contiennent une fraction égale à 15%, $\leqslant 5\%$ et $\leqslant 1\%$ de cellules positives respectivement. L'échantillon photoporé en flux avec $8 \cdot 10^7$ part./ml ($[AuNP] \times 1$) réalise une fraction positive inférieure ($\sim 40\%$) en comparaison avec la condition avec $2 \cdot 10^7$ part./ml ($[AuNP] \times 1/4$) réalisant 56%. **Fig.b)** Fraction positive globale mesuré à $J+1$. Les contrôles flux, agitation et le témoin croissance contiennent une fraction égale à 16%, $\leqslant 5\%$ et $\leqslant 1\%$ de cellules positives respectivement. L'échantillon photoporé en flux avec $[AuNP] \times 1$ réalise encore une fraction positive inférieure $\sim (41 \pm 12)\%$ en comparaison avec la condition avec $[AuNP] \times 1/4$ réalisant $(69 \pm 9)\%$. On peut remarquer que les fractions positives restent cohérentes entre $J0$ et $J+1$ globalement mais que la photoporation à concentration de nanoparticules réduites renvoie une fraction supérieure ~ 24 h après irradiation. **Fig.c)** Le facteur de survie f_s mesuré après irradiation. La comparaison entre le nombre de cellules attendues (passé en flux) et le nombre récupéré et imagé à $J0$ renvoie des facteurs de survie pour les conditions de contrôle de 80 pour le flux et 90 pour le témoin de croissance et le contrôle d'agitation. La diminution de la concentration de nanoparticules pendant l'irradiation augmente le facteur de survie de $\sim 40\%$ à $(74 \pm 8)\%$. **Fig.d)** Fraction de cellules marquées avec le P.I. après l'irradiation et les étapes de rinçage/centrifugation. Les différents contrôles (flux, agitation et croissance) contiennent respectivement ~ 9, $\leqslant 5$ et $\leqslant 5$ de cellules positives au P.I. alors que les échantillons photoporés contiennent $(45 \pm 9)\%$ et $(14 \pm 5)\%$ pour les conditions $[AuNP] \times 1/4$ et$[AuNP] \times 1/4$ respectivement. La réduction de la concentration réduit le nombre de cellules mortes pendant l'irradiation.

résulte en une meilleure fraction positive pour le FITC-Dextran par rapport à [AuNP] $\times$ 1 et une meilleure viabilité post-irradiation.

Le facteur de survie f_s est mesuré après irradiation (fig.3.10c). Les conditions de contrôle permettent de récolter et d'imager 80%, 90% et 90% du nombre de cellules passées en puce pour le contrôle flux, le témoin de croissance et le contrôle d'agitation respectivement. La diminution de la concentration de nanoparticules de [AuNP] $\times$ 1 à [AuNP] $\times$ 1/4 pendant l'irradiation augmente le facteur de survie de $\sim 40\%$ à $74 \pm 8\%$. L'effet du nombre de nanoparticules par unité de volume est donc immédiat sur la viabilité des cellules.

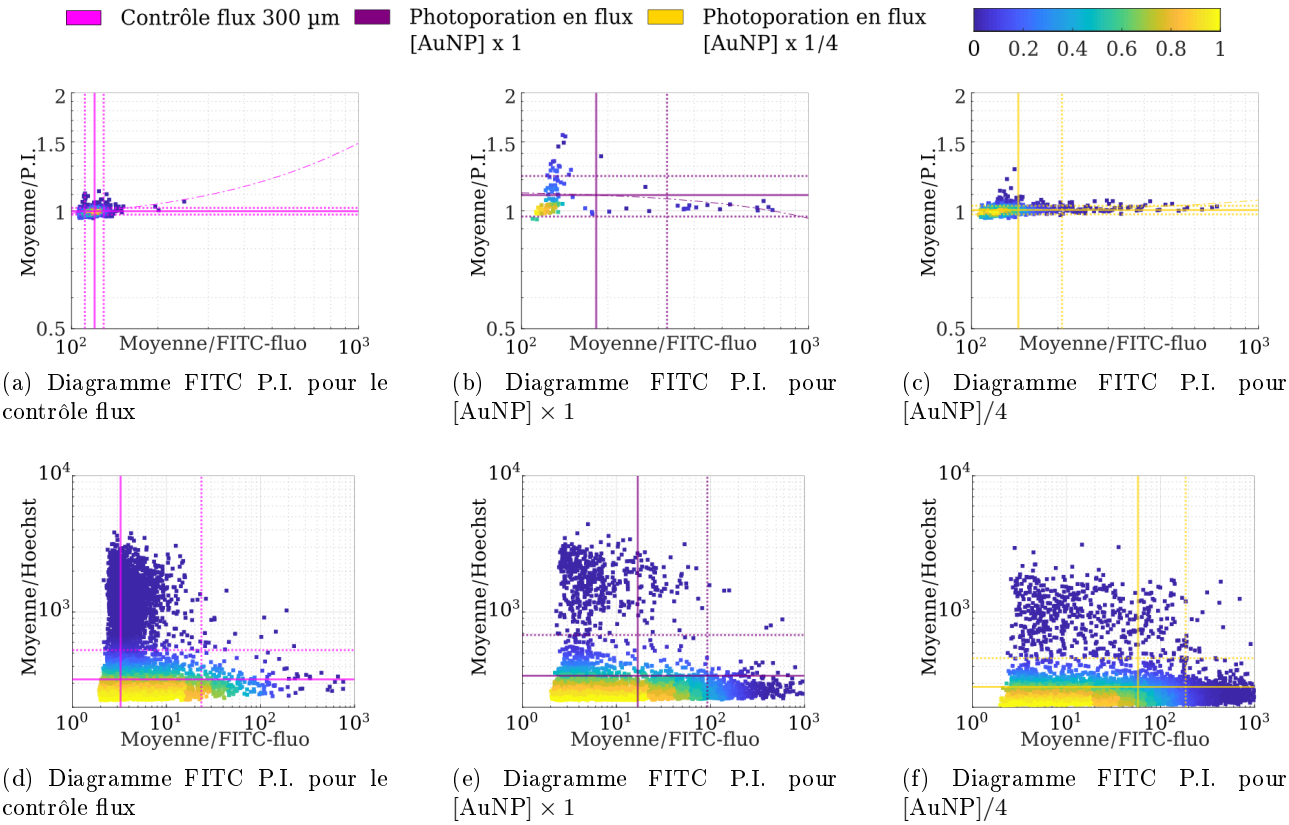
La concentration initiale de nanoparticules d'or ([AuNP] $\times$ 1) de $8 \cdot 10^7$ part./ml donne $\sim 40 - 160$ part./cell. par volume occupé par une cellule. Avec de telles densités, deux catégories d'effets sont à envisager. La première, physique, concerne la génération de nano-bulles de vapeur en cavitation. La probabilité de générer une bulle cavitante atteint un seuil avec des concentrations de l'ordre de $10^5 - 10^6$ part./ml dans le cas d'une génération autour de nanoparticules d'un diamètre de 80 nm excitées par laser (saturation de la probabilité) [166]. Dans ce cas particulier, il s'agit de cavitation photo-acoustique où le phénomène est amplifié par un champ acoustique extérieur. Cette tendance se retrouve également avec une excitation purement optique pour le signal acoustique généré (onde de choc après effondrement de la nano-bulles). Elle est notamment expliquée par l'extinction subie par l'onde d'excitation avec la création de nano-bulles (changement local d'indice optique) ou encore avec l'absorption inhérente à la suspension de nanoparticules qui dépend de la concentration [167].

Dans l'hypothèse qu'il ne s'agisse que d'une probabilité qui ne croît plus, la perméabilisation de la membrane est quand même réalisée. La deuxième catégorie d'effets est biologique en considérant la cytotoxicité liée aux nanoparticules. Outre l'impact pendant le traitement (nombre de nanopores créés), il faut également noter l'impact de l'excédent de nanoparticules non excitées en aval du traitement laser. Un des phénomènes observés lors des études de nanotoxicité est l'endocytose de ces nanoparticules qui adsorbent à la membrane cellulaire dans les temps long. Leur incorporation peut entraîner des changements de conformation de certaines protéines [96, 168]. Compte tenu de la dynamique de ces transferts intracellulaires, la viabilité n'est impactée qu'après un certain délai (48 à 72 h) selon la concentration d'intermédiaires plasmoniques [169].

Il y a donc un effet de la concentration de nanoparticules sur la performance de photoporation tant sur la fraction positive que sur la fraction de cellules mortes. La diminution de la concentration améliore la fraction positive obtenue à $J0$ et $J+1$ de $\sim 20-30\%$ et diminue la fraction de cellules mortes à des valeurs comparable à celles obtenues pour un passage en flux. Par ailleurs, la fraction positive évolue différemment entre les deux mesures selon la concentration de nanoparticules utilisée. D'une part, la gamme de détection dépend de l'objectif utilisé. Une meilleure résolution de l'émission peut modifier la distribution de la fluorescence et donc la fraction de cellules positives. Cette hypothèse est ainsi en lien avec l'efficacité d'incorporation du FITC-Dextran pendant la photoporation et par conséquent en lien avec le nombre de nanopores créés. D'autre part, la mesure à $J+1$ intègre implicitement la viabilité qui est réalisée sur un plus grand échantillon. La variabilité de la fraction positive doit être complétée par l'étude de la fluorescence intracellulaire pour évaluer l'incorporation du FITC-Dextran et sa corrélation avec le marquage P.I. et Hoechst.

3.3.2 Évolution de la fluorescence intracellulaire entre $J0$ et $J+1$

Il n'y a pas de corrélation entre marquage P.I. et incorporation du FITC-Dextran après le passage en puce (fig.3.11a, b et c). De façon cohérente avec les grandeurs globales (fig.3.10d), la réduction de la concentration de nanoparticules indique que la conjugaison du passage en flux et de la photoporation génère des nanopores réparables avant l'ajout du P.I.. Par ailleurs, avec ou sans irradiation et pour les deux gammes de concentration de nanoparticules, les cellules exprimant le P.I. ont un niveau de fluorescence FITC basal ($\sim$ 120u.a.). Dans le cas de cellules photoporées, cela est dû à la durée des nanopores qui se prolonge jusqu'au marquage P.I.. Malgré l'incorporation du FITC-Dextran, l'intégrité membranaire compromise entraîne la diffusion de la macromolécule hors du cytoplasme. Le seul signal récupéré reste celui de l'intercalant de l'ADN qui emprunte ces mêmes nanopores. Les cellules non irradiées qui expriment le P.I. ne sont également pas marquées avec le FITC-Dextran. La même justification peut s'appliquer. Il est cependant possible, compte tenu de la faible fraction de cellules



(a) Diagramme FITC P.I. pour le contrôle flux

(b) Diagramme FITC P.I. pour [AuNP] × 1

(c) Diagramme FITC P.I. pour [AuNP]/4

(d) Diagramme FITC P.I. pour le contrôle flux

(e) Diagramme FITC P.I. pour [AuNP] × 1

(f) Diagramme FITC P.I. pour [AuNP]/4

FIGURE 3.11 – **Corrélation entre les fluorescences P.I. ($J0$) et Hoechst ($J+1$) avec FITC intracellulaires des cellules perméabilisées en flux**
La fluorescence intracellulaire est mesurée à $J0$ pour le marquage P.I. et à $J+1$ pour la marquage Hoechst. Les valeurs de fluorescence intracellulaire du marquage P.I. sont normalisées par rapport à la médiane (trait plein horizontal) du témoin de croissance. **Fig.a, b, c)** Diagramme de dispersion de la fluorescence intracellulaire à $J0$ entre P.I. et FITC. Les trois conditions ne révèlent pas de corrélation entre l'incorporation et la mort cellulaire. La mort cellulaire pendant le traitement avec une concentration réduite se manifeste de la même manière que dans le cas de la concentration élevée : des pores non réparables qui laissent diffuser le FITC-Dextran hors du cytoplasme. **Fig.d, e et f)** Diagramme de dispersion de la fluorescence intracellulaire à $J+1$ entre Hoechst et FITC. Il n'y a pas de corrélation entre les deux marquages. Les fractions de la population avec une fluorescence Hoechst supérieure à ~ 1000 est inférieur à 5%, indiquant la faible présence de cellules au stade apoptotique dans les trois conditions. Par ailleurs, la condition avec $[AuNP] \times 1$ renvoie un marquage Hoechst avec une plus grande dispersion (traits pointillé horizontaux). Il peut s'agir d'un biais d'imagerie compte tenu de la fraction de cellules à fluorescence élevée.

mortes, que le marquage observé soit simplement dû aux étapes de centrifugation ou rinçage en l'absence du FITC-Dextran.

L'efficacité d'incorporation de la macromolécule, représentée par la fluorescence intracellulaire du FITC-Dextran à $J0$, est plus importante en réduisant la concentration de nanoparticules (fig.3.11). Les suspensions de cellules utilisées contiennent $\approx 1.8 - 2.6 \cdot 10^6$ cellules/ml. Avec la concentration initiale utilisée, le nombre de nanoparticules revient à $\sim 7 - 11$ et $30 - 45$ nanoparticules par cellules pour la photoporation en flux dans les conditions [AuNP] × 1/4 et [AuNP] × 1 respectivement. Par conséquent, il y a 7 à 45 sites potentiels de création de nanopores au voisinage des membranes cellulaires. Ainsi, l'augmentation du nombre de nanopores n'entraîne pas une meilleure diffusion du FITC-Dextran à l'intérieur du cytoplasme sur le court-terme (avant remise en culture). On peut en conclure que le nombre de pores est suffisant pour atteindre le régime permanent de la diffusion de l'agent exogène dans la cellule.

Le marquage nucléaire Hoechst, effectué $\sim$ 24 h après irradiation n'est pas corrélé avec le signal FITC dans la gamme des intensités élevées de façon similaire au marquage de mort cellulaire (fig.3.11). En revanche, la moyenne des intensités intracellulaires est comparable entre les échantillons non-irradiés et irradiés avec les deux concentrations de nanoparticules. Les fractions de la population avec une fluorescence Hoechst supérieure à ~ 1000 sont inférieures à 5%, indiquant la faible présence de cellules au stade apoptotique quel que soit le traitement. La fluorescence FITC intracellulaire mesurant l'efficacité d'incorporation de la macromolécule indique la même tendance obtenue avant la remise en culture. La moyenne par population est respectivement de 3, 17 et $\sim 66 \pm 10$u.a. pour le contrôle flux, la photoporation avec [AuNP] $\times 1$ et la photoporation avec [AuNP] $\times 1/4$. La création de plus de nano-pores n'améliore pas l'incorporation du FITC-Dextran en prenant en compte la viabilité.

L'augmentation du nombre de sites de perméabilisation de la membrane peut entraîner directement la mort cellulaire. La fragilisation qui en résulte peut diminuer le seuil d'endommagement par cisaillement et donc le seuil de mort dans le système fluidique ou simplement rallonger la durée de vie des nanopores devant la diffusion du FITC-Dextran en dehors du cytoplasme. Il a été montré que la viabilité des cellules soumises à de la création de pores par nano-bulles de vapeur dépendait essentiellement du processus de réparation. Les nanopores sont réparés suivant des échanges en Ca^{2+} [74, 170]. Or, le calcium est apporté en sortie de puce avec l'ajout du milieu de culture dans le tube 2 de sortie, favorisant la réparation (fig.3.2).

La taille des pores est un facteur impactant la viabilité cellulaire. Ce paramètre rend compte du rayon individuel mais aussi du nombre de pores [110]. Des rayons de 10-20 nm conduisent à une perméabilisation viable et restent réparable par la cellule [104, 110]. Pour des nanopores peu nombreux, le rayon de $\sim 100 - 200$ est critique et marque le début de la diminution de la viabilité [74]. La concentration de nanoparticules et la fluence contrôlent respectivement le nombre et le rayon des pores induits [74, 110]. Réduire le nombre de sites de perméabilisation (par la concentration), à fluence fixée, améliore la fraction positive et la viabilité des cellules photoporées en flux. Il y a donc une transition entre $\sim$ 10 part./cell. et $\sim$ 30 part./cell. où la viabilité est détériorée.

La photoporation de cellules sur substrats plasmoniques par la création de $\sim$ 70 nanopores résulte en une chute de viabilité pour des fluences autour de 0.03 J/cm^2 qui peut valoir $\sim 50 - 60\%$ selon les expositions [110]. On en déduit que la photoporation présentée ici, à des fluences supérieures, crée des nanopores plus grands que la dizaine de nanomètres. Couplé à la taille, leur nombre dans la condition $[AuNP] \times 1$ peut conduire donc à la mort cellulaire, sans mentionner les changements structurels limitant potentiellement l'établissement ultérieur de l'homéostasie chez les cellules traitées [110, 171].

Il est clair que l'augmentation du nombre de nanoparticules au voisinage d'une cellule par un facteur 4 en photoporation en flux a plus d'impact que ce qui a été mesuré en photoporation de cellules adhérentes en terme de viabilité. En effet, pour des cellules non irradiées, les effets hydrodynamiques de l'écoulement dans une puce microfluidique n'ont pas de conséquences sur la viabilité. En revanche, avec une vitesse de 0.1 m/s, les cellules passent par des zones de fort cisaillement (sortie de puce) avant la réparation des nanopores créés. Sur le court terme, plus ces derniers sont nombreux, plus le seuil d'endommagement par cisaillement est baissé. Sur un plus long terme, les cellules ainsi traitées sont mises en suspension et subissent des étapes de stress supplémentaires par rapport aux cellules adhérentes ce qui explique une plus grande sensibilité par rapport à la concentration de nanoparticules et par conséquent aux nombres de nanopores.

À concentration fixée, la modulation du nombre de nanopores générés est possible par la modification de l'irradiation et du nombre d'impulsions laser – si l'on suppose que les nanoparticules ne sont pas toutes excitées par une impulsion laser. La superposition des distributions pourrait indiquer que la durée des nanopores est suffisamment importante devant les temps de diffusions pour que le nombre de pores n'influe pas puisque les cellules sont saturées d'agent exogène. Parallèlement, le même comportement pourrait se produire si le nombre de nanopores est suffisamment important pour qu'un facteur deux ou trois appliqué au nombre d'impulsions laser n'entraîne pas de différence.

3.4 Irradiation à 1, 2 ou 3 impulsions laser pour la photoporation en flux

La réduction de la concentration de nanoparticules dans la suspension cellulaire diminue le nombre de sites de génération de nano-bulles et donc de nanopores. À concentration fixée, une impulsion génère un nombre donné de nanopores. Une irradiation avec plus d'impulsions nous indique s'il y a un phénomène d'extinction de l'onde incidente ou d'altération des nanoparticules. En cas d'amélioration de la fraction positive ou de l'efficacité d'incorporation (fluorescence moyenne), toutes les nanoparticules au voisinage d'une cellule ne sont pas excitées ou altérées et contribuent plus d'une fois à la création de nanopores par photoporation. Aussi, au taux de répétition du laser nominal, l'augmentation du nombre d'impulsions se fait en diminuant la vitesse d'écoulement dans la zone de la puce où l'irradiation se produit (fig.3.4).

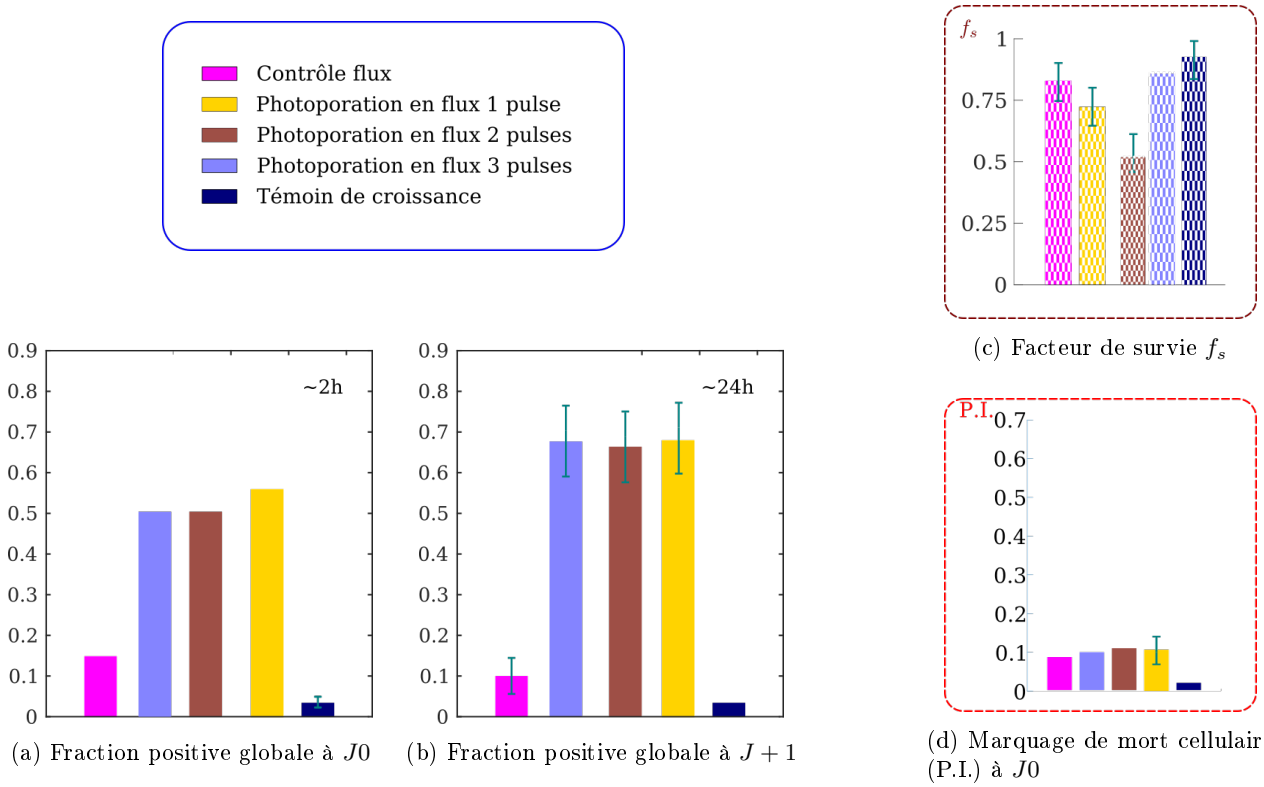
Une suspension de cellules est injectée dans la puce. Elle est mélangée à une solution de nanoparticules d'or pour une concentration finale de $2 \cdot 10^7$ part./ml ($[\text{AuNP}]_{\text{flux}}/4$), valeur avec une meilleure fraction positive que la nominale. Le débit total dans la puce est ensuite modifié entre les extractions pour irradier les cellules avec 1, 2 ou 3 impulsions laser. Les contraintes hydrodynamiques n'étant pas significativement différentes entre les débits appliqués, l'approche permet de comparer les différentes irradiations dans les conditions de fonctionnement de photoporation (taux de répétition de 10 Hz).

3.4.1 Augmentation du nombre d'impulsions de photoporation

La photoporation est réalisée avec différentes irradiations successivement à partir de la même suspension mise en flux. Cette méthode résulte en des fractions positives proches ($\sim 50\%$ à $J0$) que 1, 2 ou 3 impulsions soient appliquées pendant l'irradiation (fig.3.12a). Il apparaît qu'il n'y pas de meilleure perméabilisation des cellules en augmentant le nombre d'impulsions. La comparaison entre la mesure faite immédiatement après traitement et celle après 24 h indique une légère croissance de la fraction positive ($60-70\%$) pour toutes les conditions d'irradiation comme observé à la réduction de la concentration (fig.3.12b). L'augmentation du nombre d'impulsions ne compense pas la réduction du nombre de nanoparticules puisqu'elle ne conduit pas au même comportement. En effet, on remarque que la fraction positive augmente entre $J0$ et $J+1$ contrairement à ce qui a été observé pour l'échantillon photoporé par une impulsion avec $[AuNP] \times 1$. La distribution de la quantité de FITC-Dextran incorporé est donc large et comprend les petites et grandes valeurs.

La fraction de cellules mortes indique également que la perméabilisation n'a pas eu d'impact significatif sur la viabilité (fig.3.12d). Pour les trois types d'irradiation, le marquage P.I. renvoie une fraction de mort entre 10 et 15%, du même ordre de grandeur que le contrôle flux. Immédiatement après le traitement, le nombre d'impulsions a moins d'effets que le nombre de nanoparticules. On ne crée donc pas systématiquement plus de nanopores dans les membranes cellulaires. De ce fait, les nanoparticules n'interviennent qu'une fois dans le processus de perméabilisation pour différentes raisons possibles. À l'échelle des nanoparticules après la première irradiation, leur dégradation comme la modification de taille, de rapport d'aspect par fusion ou par fragmentation, décale la longueur d'onde pour la résonance de plasmons [150, 172]. Les excitations supplémentaires sont alors sans effets. À l'échelle du flux, la génération de nano-bulles de vapeur perturbe la suspension et le nombre de nanoparticules non altérées par la première impulsion au voisinage des cellules diminue. Il n'y a alors pas de perméabilisation supplémentaire.

Les effets hydrodynamiques supplémentaires que peuvent générer les nano-bulles de vapeur, dans le cas de la deuxième hypothèse, s'appliquent également aux cellules dans la suspension en écoulement. Ce stress mécanique, selon la fraction de cellules mortes obtenue avec le marquage P.I., ne compromet pas l'intégrité membranaire des



(a) Fraction positive globale à $J0$ (b) Fraction positive globale à $J+1$

(c) Facteur de survie f_s

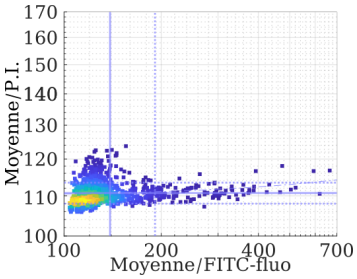
(d) Marquage de mort cellulaire (P.I.) à $J0$

FIGURE 3.12 – **Perméabilisation par photoporation en flux avec différentes irradiations**
Une suspension de cellules et de nanoparticules avec $2 \cdot 10^7$ part./ml ([AuNP] $\times$ 1/4) est injectée en flux dans une puce microfluidique de canal central de largeur 300 µm. Les débits sont adaptés pour effectuer des irradiations à une, deux ou trois impulsions (voir fig. 3.4d). **Fig.a)** Fraction positive globale mesurée à $J0$. Les conditions d'irradiations résultent en des taux de 50, 50 et 56% pour une, deux et trois impulsions respectivement. En comparaison, le contrôle flux perméabilise 15% de la population. Ces taux très proches indiquent qu'à $J0$, il n'y a pas de différence de photoporation entre les différentes irradiations. **Fig.b)** Fraction positive globale mesurée à $J+1$. Les conditions d'irradiations résultent en des taux de 72, 72 et 74% pour une, deux et trois impulsions respectivement alors que le contrôle flux crée (10 ± 5)% de fraction positive. À concentration de nanoparticules fixée, le nombre d'impulsions n'induit pas non plus d'écart significatif à $J+1$. Cependant, on peut remarquer que les échantillons photoporés renvoient un taux supérieur $\sim$ 24 h après irradiation. **Fig.c)** Le facteur de survie f_s mesuré après irradiation. La comparaison entre le nombre de cellules attendu (passé en flux) et le nombre récupéré et imagé à $J0$ renvoie des facteurs de survie (74 ± 8)%, 50% et 80% pour 1, 2 et trois impulsions respectivement. **Fig.d)** Fraction de cellules marquées avec le P.I. après l'irradiation et les étapes de rinçage/centrifugation. Les différents échantillons, de contrôle ou de photoporation, contiennent environ 10% de cellules positives au P.I. à $J0$. L'échantillon traité avec une impulsion réalise un taux à (13 ± 4)%. Le nombre d'impulsion ne semble pas être un paramètre influent sur la perméabilisation ou la viabilité des cellules irradiées.

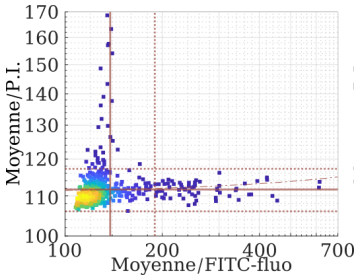
cellules. Cependant, son effet peut s'appliquer à l'homéostasie des cellules après la remise en culture [110, 171]. Cette hypothèse peut être vérifiée par la mesure du facteur de croissance f_c introduit auparavant et décrivant la croissance de la population cellulaire après remise en culture.

3.4.2 Fluorescence intracellulaire entre $J0$ et $J+1$

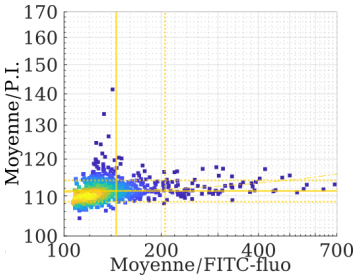
L'efficacité d'incorporation du FITC-Dextran, à travers la fluorescence intracellulaire moyenne, n'est pas améliorée par le nombre d'impulsions puisque les trois échantillons ont une moyenne autour de ~ 120 u.a. quelques heures après photoporation (fig.3.13a, b et c). Obtenue avec une meilleure ouverture numérique, la même fluorescence intracellulaire à $J+1$ a des valeurs de 69, 96 et $\sim 66 \pm 10$ u.a. pour le traitement avec 3, 2 et 1 impulsion respectivement (fig.3.13d, e et f). La dispersion du signal FITC intracellulaire (écart-type sur la fluorescence moyenne de ~ 100 *u.a.*) indique que la différence entre les moyennes de fluorescence n'est pas significative,



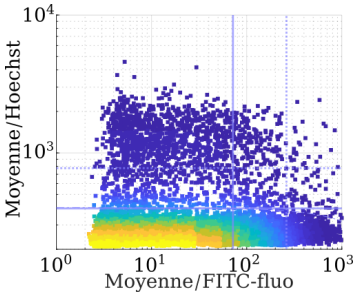
(a) Diagramme FITC P.I. pour 3 impulsions



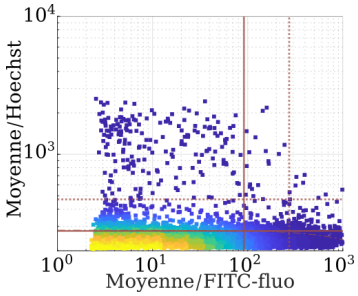
(b) Diagramme FITC P.I. pour 2 impulsions



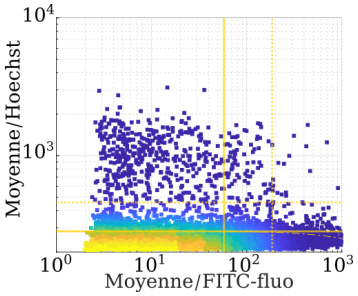
(c) Diagramme FITC P.I. pour 1 impulsion



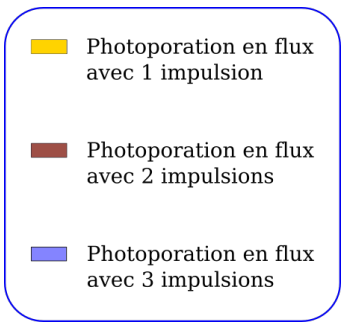
(d) Diagramme FITC Hoechst pour 3 impulsions

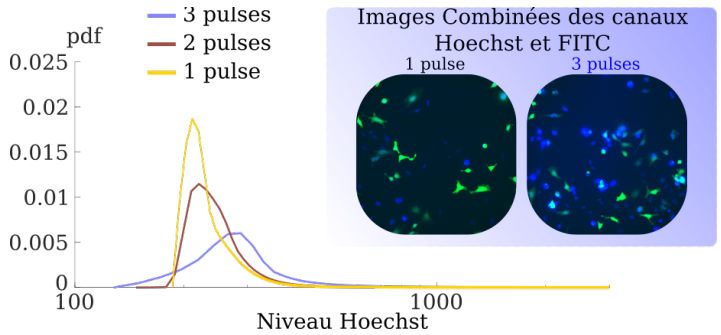


(e) Diagramme FITC Hoechst pour 2 impulsions



(f) Diagramme FITC Hoechst pour 1 impulsion





(g) Distribution des intensités du marquage Hoechst

FIGURE 3.13 – **Corrélation entre P.I. et Hoechst avec FITC intracellulaire individuelle des échantillons perméabilisés par 1, 2 ou trois impulsions**
La fluorescence intracellulaire est mesurée à $J0$ pour le marquage P.I. et à $J+1$ pour la marquage Hoechst. **Fig.a, b et c)** Diagramme de dispersion de la fluorescence intracellulaire P.I. moyenne en fonction de la fluorescence FITC moyenne indiquant l'absence de corrélation entre les deux marquages. Pour la fluorescence FITC-Dextran, les trois échantillons ont une moyenne autour de $\sim$ 120 u.a.. De même pour la fluorescence P.I., les trois échantillons ont des valeurs de médianes voisines ($\sim$ 110 u.a.), équivalentes au niveau d'intensité basal obtenu en obscurité. **Fig.d, e et f)** Diagramme de dispersion de la fluorescence intracellulaire Hoechst moyenne en fonction de la fluorescence FITC moyenne montrant l'absence de corrélation entre les deux marquages. La fluorescence intracellulaire est de 69, 96 et $\sim 66 \pm 10$ u.a. pour le traitement avec 3, 2 et 1 impulsion respectivement à $J+1$. L'échantillon traité avec 3 impulsions contient $\sim$ 13% de la population avec un niveau d'intensité de fluorescence Hoechst supérieur à $\sim$ 500 u.a. pour $\leqslant$ 5% pour les autres conditions. **Fig.g)** Distribution des niveaux d'intensité pixel à pixel du marquage Hoechst (non moyenné par cellules). La distribution du signal Hoechst est également décalée vers les intensités hautes dans le cas de l'irradiation avec 3 impulsions (moyenne à $\sim$ 400 u.a.) par rapport à une irradiation avec moins d'impulsions (respectivement 280 et 300 ± 20 u.a.).

d'autant plus que les écarts enregistrés entre contrôle flux, [AuNP] $\times$ 1 et concentration réduite sont de l'ordre de quelques dizaines d'unités d'intensité. Il n'y a pas de différence marquée à $J+1$ contrairement à la variation directe de nanopores.

La mort cellulaire n'est pas corrélée avec l'incorporation du FITC-Dextran à $J0$ (fig.3.13a, b et c). En revanche le marquage Hoechst est différent selon les irradiations sans une corrélation nette avec le FITC-Dextran. L'échantillon traité avec 3 impulsions contient $\sim 13\%$ de la population avec un niveau d'intensité de fluorescence Hoechst supérieur à ~ 500 u.a. pour $\leqslant 5\%$ pour les autres conditions (fig.3.13d, e et f)). La distribution du signal Hoechst est également décalée vers les intensités hautes dans le cas de l'irradiation avec 3 impulsions (moyenne à ~ 400 u.a.) par rapport à une irradiation avec 1 et 2 impulsions (respectivement 280 et 300 ± 20 u.a.).

L'augmentation des impulsions a donc un effet sur l'incorporation du Hoechst et ainsi sur l'état de la cellule. Par ailleurs, en mesurant l'intensité des images Hoechst pixel par pixel avant la segmentation, les distributions d'intensité sont nettement en décalage l'une par rapport à l'autre (fig.3.13g). Cette analyse revient à considérer le signal extra-cellulaire. Or, le Hoechst qui est intercalant de l'ADN n'émet pas de fluorescence autrement. Toute chose égale par ailleurs, ce décalage vers les hautes intensités avec le nombre d'impulsions croissant indique la présence en suspension de débris d'ADN auxquels le Hoechst s'est lié. Ces débris proviennent probablement de cellules mortes.

Les fractions positives et les efficacités d'incorporation de FITC-Dextran très proches pour les différentes conditions d'irradiation traduisent l'absence de lien entre nombre d'impulsions et degré de perméabilisation. En l'occurrence, les nanoparticules excitées pour générer des nano-bulles de vapeur, créatrices de nanopores dans les membranes cellulaires, n'interviennent plus dans le processus de photoporation avec les irradiations ultérieures. Cette conclusion est aussi confirmée par le marquage P.I. qui renvoie des valeurs similaires au contrôle flux. Puisque l'augmentation directe du nombre de nanopores par la concentration de nanoparticules renvoie une fraction de cellules mortes importante après traitement ($\sim 45\%$), l'effet observé *via* le marquage Hoechst dans le cas de la variation du nombre d'impulsions est sur un plus long terme et n'est pas initié par une intégrité membranaire compromise.

Le nombre de nano-pores créés sur la membrane cellulaire est contrôlé directement par la concentration de nanoparticules au voisinage des cellules. Pour la photoporation de cellules adhérentes, les nanoparticules adsorbées sont irradiées avec peu de variabilité. L'onde incidente traverse la cellule considérée comme un milieu absorbant et dispersant de dimensions de l'ordre de la largeur à mi-hauteur du faisceau ($\sim 20-100$ µm en comparaison avec le FWHM de ~ 140µm) [173]. Les nanoparticules sont alors excitées par des ondes dispersées de façon similaires et avec des valeurs voisines de fluence. Suite à l'irradiation, les nanoparticules sont altérées par fusion ou fragmentation directement par l'excitation ou la cavitation de la nano-bulle de vapeur [79, 150]. La deuxième hypothèse est remise en question puisqu'elle se produit avec l'effondrement de la nano-bulles, une étape qui ne serait pas favorisée à cause de la présence des nanoparticules [66, 78].

Des impulsions laser supplémentaires n'ont donc pas d'effets si tous les intermédiaires plasmoniques ont été excités et altérées. Dans le cas de la suspension pour la photoporation en flux, la densité élevée et la répartition des nanoparticules dans l'espace peuvent entraîner des phénomènes d'écrantage ou une variabilité de fluence d'excitation [158]. Certaines nanoparticules même irradiées ne sont alors pas altérées. L'augmentation des impulsions peut alors créer des nanopores supplémentaires et influer sur l'incorporation du FITC-Dextran ou de la viabilité pendant le traitement par photoporation en flux [167]. Or, les différentes valeurs obtenues pour les trois conditions en terme de perméabilisation et de viabilité contredise cette hypothèse et confirme que les nanoparticules ne contribuent plus après la première irradiation (fig.3.12).

Cependant, la condition avec trois impulsions laser pendant l'irradiation est décrite par une fluorescence intracel-

lulaire de Hoechst différentes des autres types d'irradiation. S'il n'existe plus d'intermédiaire plasmonique pour interagir avec le faisceau laser de photoporation, il reste les parois du canal microfluidique et la manifestation de cette interaction par la perturbation du flux pendant l'écoulement. L'irradiation avec un laser nanoseconde peut générer un plasma qui induit une détérioration du diélectrique par dépôt d'énergie [174]. La génération de plasma peut s'accompagner d'émission d'ondes de choc sphériques dans le canal microfluidique [175]. La multiplication de ces phénomènes *via* le nombre d'impulsions laser s'accumule aux contraintes générées lors de la photoporation par intermédiaire plasmonique ou de l'écoulement microfluidique. Des sollicitations à répétition peuvent induire la fragilisation de la membrane cellulaire qui peut se manifester par des modifications des propriétés mécaniques de la membrane sans pour autant altérer directement la viabilité [176]. L'accumulation du stress perturbe alors l'équilibre métabolique et expliquerait les différences du marquage Hoechst.

Le paramètre déterminant dans le contrôle de la perméabilisation *via* le nombre de nanopores créés est la concentration de nanoparticules d'or. Le nombre d'impulsions dans la gamme de concentration explorée n'induit pas d'amélioration de la fraction positive ou de baisse de viabilité indiquant l'absence de nanoparticules "excitables" après la première impulsion. La réduction de la concentration d'un facteur 4 par rapport à la valeur nominale (2 au lieu de $8 \cdot 10^7$ part./cell.) améliore sensiblement la viabilité et la fraction positive. Par ailleurs, ce dernier évolue entre $J0$ et $J+1$. L'augmentation de la fraction positive, liée à l'ouverture numérique de l'objectif utilisé, est due à une détection plus sensible des faibles fluorescence, *i.e.* les cellules ayant incorporé peu de FITC-Dextran. Une concentration de nanoparticules plus élevée multiplie le nombre de nanopores au dépend de la viabilité et la distribution de la fluorescence est alors tronquée par la viabilité pour les valeurs élevées. Seules les cellules perméabilisées de façon intermédiaire survivent. Pour la concentration diluée, on retrouve les cellules modérément et faiblement perméabilisées ce qui augmente la fraction positive entre les deux mesures faites respectivement à $J0$ et $J+1$.

4 Conclusions sur la photoporation en flux

Le dispositif optique développé et le protocole biologique et d'analyse mis en place lors du Chapitre 2 ont été adaptés à l'utilisation opto-fluidique pour la photoporation en flux de cellules biologiques remises en suspension. En utilisant une géométrie de focalisation hydrodynamique, les échantillons sont mis en flux et irradiés par un faisceau elliptique issu du laser Q-switch avec une fréquence de répétition de 10 Hz. Des outils de suivi et de caractérisation ont été introduits pour décrire les performances de la photoporation suivant les deux critères de perméabilisation et de viabilité définis précédemment.

La photoporation en flux introduite dans ce chapitre consiste à irradier un échantillon constitué d'un mélange d'une suspension de cellules et d'une suspension de nanoparticules sans pré-incubation. L'irradiation se fait dans une puce microfluidique où les débits sont contrôlés pour moduler le nombre d'impulsions appliquées à la suspension. Le nombre de nanoparticules peut être modifiée directement avant l'injection de l'échantillon en changeant la suspension. Cette approche reste compatible avec différents types cellulaires (adhérents ou en suspension) et n'a pas de limitation quant aux types d'intermédiaire plasmonique.

La comparaison de la photoporation en flux avec la photoporation de cellules adhérentes confirme la génération de nano-bulles de vapeur entraînant la perméabilisation de la membrane cellulaire. Au vue de la fluorescence mesurée dans le canal FITC, afin d'évaluer l'efficacité d'incorporation, la fluorescence moyenne de la condition en flux est intermédiaire entre les deux conditions de concentrations de nanoparticules pour la photoporation de cellules adhérentes. Cela indique que l'incorporation obtenue en flux est supérieure. Puisque l'efficacité d'incorporation obtenue lors de la photoporation de cellules adhérentes avec 80 part./cell. est moins importante que la condition nominale, on peut supposer que le mécanisme d'incorporation du FITC-Dextran dans le cytoplasme diffère entre configuration statique et configuration en flux. La pré-incubation entraîne l'adsorption des nanoparticules aux membranes cellulaire dans le cas de la photoporation de cellules adhérentes. Comme l'adsorption n'est pas favorisée en flux, on peut penser que les nanoparticules sont au voisinage de la membrane séparées d'une couche de liquide. Les nano-bulles sont formées et la cavitation aboutit à la formation d'un nano-jet à l'effondrement car la distance de séparation est non nulle.

Selon les conditions d'irradiation et les configurations microfluidiques testées, les fractions positives obtenues par photoporation en flux varient entre $\sim$ 40 et $\sim$ 75%. La viabilité, mesurée par le facteur de survie ou le marquage P.I., varie entre 40 et $\sim$ 80%. Le principal paramètre qui influe sur ces deux grandeurs est le nombre de nanoparticules par cellules. Il contrôle directement le nombre de nanopores créés pendant l'irradiation sur la membrane cellulaire. En effet, le nombre d'impulsions appliquées à la suspension n'influe pas directement sur les performances de photoporation. Cela implique que tous les intermédiaires plasmoniques, à la concentration étudiée, interviennent dès la première impulsion laser.

La faible viabilité est la limitation principale de cette technique. Les différents contrôles flux confirment le faible impact du circuit d'écoulement sur la viabilité des cellules. Mais le cumul des différentes sources de stress pendant le traitement comme la perméabilisation par photoporation, les contraintes de cisaillement pendant l'écoulement en canal microfluidique et le couplage potentiel avec les étapes de préparation d'échantillons (remise en suspension, rinçage et centrifugation) entraîne la mort cellulaire. Cependant la réduction de la concentration a permis d'améliorer la fraction de cellules vivantes de 40 à $\sim$ 75%, légèrement en dessous des valeurs obtenus pour la photoporation de cellules adhérentes dans les conditions nominales.

L'autre limitation est induite par la fréquence de répétition du laser. Les débits microfluidiques utilisés sont bornés et permettent le traitement de $\sim 50-150$ cell./s. Cette fréquence de traitement est comparable à certaines valeurs disponibles dans la littérature obtenus par des techniques opto-fluidiques mais elle reste faible devant des techniques purement fluidiques. La recherche d'un optimum de concentration de nanoparticules, ainsi que la photoporation à l'aide d'un laser à fréquence de répétition plus élevée, permettront d'améliorer la viabilité et d'augmenter la cadence de traitement.

Les études de l'influence du nombre d'impulsions et du nombre de nanoparticules au voisinage des cellules indiquent que la valeur critique de ce dernier est entre ~ 10 part./cell. et ~ 30 part./cell. où la viabilité est détériorée. Contrairement à l'augmentation de la concentration de nanoparticules qui conduit directement à la création de plus de nanopores, un nombre supérieur d'impulsions semble causer des effets sur le long terme *via* les contraintes hydrodynamiques supplémentaires. Les impulsions supplémentaires génèrent un effet non pas par l'intermédiaire de nanoparticules mais *via* l'interaction avec les parois du canal.

Cette hypothèse est avancée puisque l'on a observé un endommagement de la surface en verre de la puce corrélé avec l'application du laser de manière non systématique (variabilité de l'endommagement). L'apparition d'impacts s'accompagnait de perturbation du flux qui désorganisait l'écoulement de la suspension pendant le traitement de photoporation en flux. L'impact de ces effets hydrodynamiques reste moindre sur la viabilité des cellules ou sur l'évolution de la fluorescence FITC-Dextran de la population par rapport à ce que l'on a pu voir avec la concentration de nanoparticules. Les deux inconvénients majeurs restent donc l'endommagement du Pyrex® qui constitue la partie transparente de la puce et la désorganisation du flux de cellules. Ce dernier point n'était pas critique dans le cas de la suspension tant que les phases ne sont pas séparées puisque l'on considère que les nanoparticules sont réparties autour des cellules.

L'endommagement induit par laser résulte du claquage de diélectrique ou de dénaturation thermique selon les temps et énergie caractéristiques de l'impulsions laser. Pour le Pyrex®, nous observons des endommagements non systématiques apparaissant entre 2 et 3 J/cm^2 (pouvant se produire après quelques secondes ou quelques heures d'illumination par le laser). Une alternative à ce matériau est le BK7 (borosilicate) pour lequel le seuil d'endommagement par le laser utilisé est de l'ordre de 4-5 J/cm^2. Mais son utilisation nécessite de revoir les étapes de microfabrication de la puce microfluidique (assemblage anodique avec les substrats de Si).

Cette première étape dans la séparation des deux phases biologique et plasmonique lors de la photoporation a été réalisée en éliminant l'étape de pré-incubation. Cependant, les débris issus de l'altération des nanoparticules par les impulsions laser restent dans l'échantillon biologiques après traitement. Dans la suite du manuscrit, une approche est mise en place pour séparer les deux phases cellules-nanoparticules avant et pendant le traitement de photoporation en flux et à l'extraction de l'échantillon. En se basant sur des techniques de focalisation hydrodynamique, des approches permettant l'organisation des écoulements cellulaires et de nanoparticules et le contrôle de la distance entre ces deux derniers sont exploitables pour l'application à la photoporation en flux avec séparation.

CHAPITRE 4

ORGANISATION SPATIALE DE NANOPARTICULES EN MICROFLUIDIQUE POUR LA PHOTOPORATION EN FLUX : CONTRÔLE DE LA DISTANCE CELLULES-NANOPARTICULES

Préambule :

Le mécanisme d'intérêt de la photoporation par l'intermédiaire de nanoparticules d'or est la génération de nano-bulles de vapeur. La dynamique de ces cavités crée des mouvements de fluide et émet des ondes qui peuvent se propager. La photoporation est donc possible sans contact entre les cellules et les nanoparticules irradiées. Les résultats du Chapitre 3 obtenus dans une puce microfluidique montrent que la photoporation en flux est réalisée dans des conditions ne favorisant pas l'adsorption des intermédiaires plasmoniques aux membranes des cellules en écoulement.

La réalisation du protocole de photoporation en flux s'est faite en se basant sur une géométrie de focalisation hydrodynamique. Elle a pour intérêt d'organiser l'écoulement de la suspension contenant des cellules et des nanoparticules pour le superposer avec le faisceau laser dans la zone d'irradiation (milieu du canal principal). Ce même type de géométrie est exploité pour l'organisation des deux suspensions séparées. L'objectif est donc de réaliser une photoporation en ne mélangeant pas la phase biologique avec la suspension d'intermédiaires plasmoniques.

Dans ce chapitre, deux méthodes d'organisation de flux sont présentées permettant la séparation de nanoparticules des cellules. En exploitant le phénomène de focalisation hydrodynamique, la première méthode consiste à utiliser les flux de gaine comme porteurs de nanoparticules et le flux central comme porteur de cellules. La deuxième méthode introduit un flux séparateur via la voie centrale. Deux niveaux de focalisation sont utilisés .Les entrées latérales du premier portent respectivement les nanoparticules et les cellules. Le deuxième niveau introduit des liquides de gaine.

Ces deux configurations sont explorées numériquement et validées expérimentalement. Elles visent à mettre au point une approche permettant de moduler la distance entre le site de nucléation des nano-bulles de vapeur (nanoparticules) et la cible (cellules). D'une part, les contraintes sont modifiables en variant la distance. D'autre part, les cellules et les nanoparticules sont séparées pendant l'irradiation afin d'extraire des échantillons sans nanoparticules ou débris potentiellement toxiques.

1 Organisation de particules en écoulement microfluidique

La photoporation par génération de nano-bulles de vapeur est compatible avec une utilisation en puce microfluidique. Elle permet l'incorporation du FITC-Dextran mais les cellules restent en contact avec les nanoparticules d'or ou leur débris après irradiation, ce qui nécessite une étape de filtration après traitement qui s'accompagne d'un stress supplémentaire.

La transfection par photoporation est réalisée à l'aide d'une impulsion laser à fluence donnée. L'utilisation des nanoparticules plasmoniques permettent de réduire le seuil de fluence nécessaire à la perméabilisation des membranes pour améliorer la viabilité. Par ailleurs, ces mêmes nanoparticules peuvent réduire la viabilité. Le couplage avec la microfluidique permet ainsi d'exploiter l'optimisation de l'énergie optique par ces intermédiaires plasmoniques ainsi que la limitation des effets sur la viabilité des cellules en les séparant de ces derniers.

Absorption des nanoparticules et induction de stress

L'or, à l'échelle macroscopique, est considéré comme un élément biologiquement inerte. Pour des structures nanométriques en revanche, la cytotoxicité de ce matériau dépend de plusieurs paramètres [89, 90]. L'impact de ces structures se manifeste notamment à leur absorption dans le cytoplasme. La taille des éléments de quelques nanomètres est du même ordre de grandeur que certains éléments incorporés par l'endocytose [93, 94]. De plus, à ces échelles, le rapport surface sur volume est élevé, entraînant une interaction plus favorisée entre les atomes de la surface des nanoparticules et les composants du cytoplasme [95].

Un des principaux mécanismes influant sur la cytotoxicité est la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) qui induisent un stress oxydant [89, 97]. Ce stress entraîne dans certains cas la mort cellulaire par nécrose ou apoptose [98, 99]. Si la mort n'est pas systématique, des voies de réponse au stress sont activées [100]. La génération de ROS (qui peut atteindre un maximum après $\sim$ 3 h) dépend de la durée d'exposition et de la dose [95]. Elle peut impliquer des modifications du réseau d'actine du cytosquelette. D'une part, l'actine est importante dans les processus endocytotiques [100]. D'autre part, la modification de la morphologie (élongation) et des propriétés mécaniques (élasticité) impacte l'équilibre biomécanique face à de potentiels stimuli extérieurs [95]. Ces deux éléments perturbent donc l'état de la cellule pouvant entraîner des conséquences sur l'adhésion, les mécanismes d'endocytose ou de perméabilisation et donc ainsi altérer leurs fonctions *in vivo*.

Sur le plan plasmonique, la réduction de la cytotoxicité peut se faire par fonctionnalisation de surface en enrobant les nanoparticules de différents polymères (dextran ou PEG par exemple). Ces modifications de surfaces peuvent modifier le comportement plasmonique des nano-structures et peuvent se dégrader dans le temps [100]. La modification de la géométrie (rapport d'aspect ou taille) modifie également la cytotoxicité mais impose alors des conditions d'irradiation [99]. Sur le plan biologique, la cytotoxicité varie bien entendu d'une lignée cellulaire à l'autre mais également suivant le type de culture – la surface de contact étant plus importante en 3D ou en suspension, les cellules sont plus sensibles [93, 100]. Par conséquent, la dépendance vis-à-vis de ces paramètres de cytotoxicité doit être compensée par la séparation des nanoparticules et cellules pour garantir la versatilité du protocole de photoporation en flux par rapport aux types cellulaire et de nanoparticules.

Stabilité de contrôle et de cadence en microfluidique

La séparation des cellules et des nanoparticules en flux requiert le contrôle de la distance. En effet, la dynamique des bulles de cavitation comportent plusieurs phases où des contraintes sont générées par différents phénomènes. Par exemple, pendant l'oscillation radiale de la nano-bulle, le mouvement du fluide crée des défor-

mation par cisaillement [177, 178]. À l'effondrement, selon l'environnement, une onde de pression ou un nano-jet sont créés et apportent des contraintes perméabilisant la membrane cellulaire voisine [77, 159].

Par leur propagation dans un milieu aqueux, ces contraintes s'atténuent avec la distance. Le contrôle de la distance entre les sites de nucléation des nano-bulles de vapeur et la membrane cellulaire à perméabiliser est donc un moyen de contrôler les contraintes selon la sensibilité de la cellules ou la taille de nanopores désirée pendant la photoporation en flux. La précision de ce contrôle dépend alors de la stabilité des flux, caractéristique des écoulements en microfluidique [114, 115]. L'usage de la focalisation hydrodynamique présentée dans le Chapitre 3 a pour but d'organiser la suspension dans la direction orthogonale à l'écoulement pour correspondre à la géométrie du faisceau d'irradiation. Le contrôle de la distance dans le cas des suspensions séparées doit se faire dans cette même direction mais aussi être maintenu le long de la zone d'irradiation dans le canal principal de la puce microfluidique. Différentes techniques existent pour le contrôle et l'organisation des écoulements multi-phasiques. Elle peuvent être classées en techniques "passives" et "actives".

Un exemple de technique "passive" est la focalisation inertielle déjà mentionnée dans le Chapitre 3. L'augmentation des débits en canal microfluidique rend les effets inertiels plus importants. Deux forces en résultent (cisaillement et portance) et s'équilibrent dans une position de l'axe orthogonale à l'axe du canal et donc à la direction de l'écoulement [155–157, 179, 180]. Le déplacement induit des particules en suspension (cellules ou nanoparticules) dépend de la taille de la particule et des viscosités des liquides en jeu [180, 181]. Expérimentalement, pour des cellules de l'ordre de ~ 10 µm dans un canal de dimension caractéristique ~ 100 µm, une focalisation complète est établie après une distance $\geqslant 1$ cm. Cette distance croît avec le nombre de Reynolds de l'écoulement (Re) et dépend du rapport d'aspect de la section du canal [156, 157]. L'usage d'une géométrie curviligne rajoute une composante centrifuge qui réduit cette distance d'établissement à ≈ 3 mm [155, 157, 182, 183].

Des techniques "actives" existent pour réaliser plus finement un tel contrôle. L'application d'un champ extérieur (acoustique, optique, électrique) permet d'appliquer des forces dont la direction est contrôlée dans une puce microfluidique. L'interaction directe entre des particules en écoulement, comme des cellules par exemple, et les champs extérieurs permet une organisation au sein de l'écoulement. Par exemple, l'utilisation de pinces optiques permet l'accélération et le piégeage de particules micrométriques [117]. Appliquée à des cellules ou des nanoparticules, la force de pression radiative issue d'un laser continu permet le positionnement de l'objet à différents endroits d'un canal microfluidique et par conséquent sur différentes lignes de courant [111]. Dans un milieu liquide, la vitesse de déplacement de particules micrométriques soumises à de tels rayonnements est de l'ordre de ~ 0.1 mm/s, une valeur très basse pour optimiser la cadence de traitement en microfluidique [117].

L'utilisation d'un champ acoustique stationnaire est courante dans la littérature avec le développement des éléments piézo-électriques. De plus, il est non-invasif et ne nécessite pas de marquage [184, 185]. Appliqué dans un canal microfluidique par exemple, il crée des zones de ventre et de noeuds de pression qui interagissent avec les particules en flux selon leurs densités [116, 186, 187]. D'une part, cette approche acousto-fluidique permet de positionner dynamiquement les particules en modulant la force de radiation acoustique. D'autre part, sa sélectivité implique la séparation des phases et réalise ainsi l'organisation de l'écoulement selon le type de particules ou l'orientation du champ [116, 188, 189]. Cependant, l'application d'un champ acoustique dans la zone d'irradiation par le laser Q-switch de la photoporation peut interférer avec la dynamique des nano-bulles de vapeur et modifier leur (génération, taille, ondes émises) [190].

L'introduction de certains marqueurs intermédiaires comme des particules magnétiques ou polarisables amé-

liore la sélectivité lors de l'utilisation d'autres types de champs comme des champs électriques ou magnétiques [151, 152]. La diélectrophorèse par exemple exploite la charge électrostatique nette de la particule ou sa polarisation diélectrique [191]. L'avancement des techniques de lithographie et de microfabrication rend l'introduction d'électrodes facile et peu onéreuse. Le contrôle et l'organisation d'écoulements multiphasiques pour la séparation des phases ou leurs positionnements sont ainsi facilement réalisables [192, 193]. Cependant, la dépendance de paramètres tels que la permittivité des particules et l'existence de phénomènes annexes pouvant concourir aux forces appliquées, rendent la mise en place propre à chaque lignée cellulaire ou type d'objets en écoulement.

De façon similaire, la magnétophorèse exploite les propriétés magnétiques des objets à défléchir [152]. Le mouvement des particules, en prenant l'exemple d'un écoulement sanguin, varie selon si ces dernières sont diamagnétiques (globules blancs) ou paramagnétiques (globules rouges) [194]. Il est par ailleurs possible d'introduire des outils de marquage pour attribuer aux cellules des propriétés magnétiques et augmenter leur réaction au champ appliqué, une étape supplémentaire dans le protocole de préparation des échantillons [195].

Ces techniques, actives ou passives, peuvent être combinées entre elles pour compléter l'action sur les particules en écoulement. Par exemple, l'exploitation d'un champ électromagnétique avec des forces capillaires inhérentes au canal microfluidique permet de discriminer entre particules chargées et marquées magnétiquement et d'orienter leur écoulement [196]. La magnétophorèse et l'acoustophorèse sont également compatibles avec les aspects inertiels comme les forces hydrodynamiques ou la sédimentation [194, 197].

Un autre type de combinaison existe dans la littérature mêlant des aspects actifs notamment hydrodynamiques (électro-osmose,variation de débit) et inertiels. Des particules peuvent être piégées, orientées et guidées dans des pièges hydrodynamiques de façon active [198–200]. Cette approche consiste finalement à confiner ponctuellement une particule dans le temps pour la déplacer. Le confinement peut être linéaire en un sens où les particules suivent un écoulement focalisé. L'usage de géométrie en Y est utilisé combiné à des effets inertiels (cisaillement et portée due à la paroi) ou actifs comme des impulsions de débits [181, 201]. Ces deux méthodes permettent le positionnement des particules selon leur taille, portées par des liquides de viscosités éventuellement différentes.

Comme mentionné dans la section introductive du Chapitre 3, l'utilisation de liquides de gaine pour la focalisation hydrodynamique rend cette dernière compatible avec les hauts et bas Reynolds où les effets inertiels sont négligeables. Le contrôle de particules dans la direction orthogonale du canal peut être réalisé par la focalisation, comme ce qui a été réalisé dans les pièges hydrodynamiques pour des liquides de viscosité comparable (milieu de culture ou tampon salin). Compte tenu des différents paramètres géométriques et physiques caractérisant les circuits microfluidiques, la détermination des grandeurs à varier pour un contrôle optimal doit préférentiellement coupler une approche numérique et une validation expérimentale.

Modélisation d'un écoulement multiphasique

Il existe plusieurs méthodes pour étudier la distribution d'objets rigides dans un fluide en écoulement. Dans un canal, la position d'une sphère en écoulement dépend de la nature de ce dernier. Les techniques de simulation visent donc à suivre ces objets par rapport aux équations du fluide, déterminées notamment par la méthode des éléments finis. Selon la taille des objets, l'interaction peut être dans les deux sens à savoir l'action du fluide sur les particules et l'action inverse. En effet, les tailles caractéristiques des systèmes étudiés définissent les contributions à considérer dans la résolution des équations du système fluide-corpuscule. La modélisation des interactions fluide-structure se fait à l'échelle macroscopique par deux catégories d'approches : les approches

avec maillages fixes et les approches avec des maillages conformes à l'objet [202].

La méthode des frontières immergées (*Immersed Boundary method*) à titre d'exemple, considère la frontière du solide dans le fluide en considérant que le domaine fluide est représenté par un maillage cartésien fixe. La description Eulérienne s'applique ainsi aux variables fluides et la description Lagrangienne aux objets immergés. Pour rendre compte de l'interaction fluide-solide, la méthode introduit un terme de forçage (terme source) dans l'équation de l'écoulement (Navier-Stokes) *via* des conditions aux bords [203, 204]. La résolution de l'équation donne alors la vitesse du fluide dans tout le domaine. De manière similaire, la méthode du domaine fictif divise l'espace de calcul – et son maillage global – entre le domaine solide et le domaine fluide [205, 206]. Le corps immergé est alors remplacé par un fluide auquel est attribué un mouvement solide. La contrainte du mouvement rigide du maillage local ainsi obtenu est relaxée en appliquant un multiplicateur Lagrangien ou un opérateur de pénalité pour enfin aboutir à l'équation du fluide dans tout le domaine [205, 207, 208].

La deuxième catégorie combine le maillage fixe pour le domaine fluide (approche Eulérienne) et un maillage mobile pour le corps rigide (approche Lagrangienne). La méthode Lagrangienne Eulérienne Arbitraire (ALE) par exemple, est basée sur un maillage suivant les bords du liquide autour des particules [209]. Après résolution de l'équation du fluide, la position de la particule prend une nouvelle valeur et le domaine de calcul est maillé à nouveau [202, 210, 211]. De façon itérative, le comportement du corps dans le liquide est calculé et peut être appliqué à un grand nombre de particules dans le cas de la sédimentation par exemple [212]. Cependant, des alternatives moins complexes existent dans le cas de particules nanométriques.

La modélisation de nanoparticules en écoulement dans un canal microfluidique (nanoparticules magnétiques pour la magnétophorèse) est possible suivant une approche d'interaction dans une direction et un modèle réciproque [213]. D'une part, on peut considérer l'effet du champ magnétique sur la nanoparticule, orientant dans un premier temps, la contribution à sa vitesse d'écoulement par le biais d'une description Lagrangienne pour le solide. Dans un second temps, la description Eulérienne pour le fluide résout l'équation de Navier-Stokes de l'écoulement et fournit la vitesse de la particule, égale à celle du fluide porteur. D'autre part, le modèle réciproque permet le couplage entre les deux phases – nanoparticules et liquide – et la prise en compte de l'interaction corps-fluide. L'interaction est ainsi implémentée en introduisant un terme source dans la partie moment de l'équation de Navier-Stokes. Ce terme est en fait la réaction des particules à la force de traînée du fluide par effet magnétique.

Ce couplage entre force fluidique et force magnétique peut également être complété par un système de convection-diffusion en considérant une phase de nanoparticules et non plus de particules individuelles [214]. En effet, le suivi individuel des nanoparticules en écoulement, soumises ou non à un champ externe, peut être exigeant en ressources de calcul, selon la concentration utilisée. Dans ce cas, à chaque pas de temps, la position de la particule est recalculée en prenant en compte les contributions du champ externe et de la force de traînée. La force issue du champ est alors calculée à la nouvelle position et le pas de temps suivant est traité [215]. En considérant les nanoparticules comme une deuxième phase dispersée dans la première phase continue (fluide en écoulement), le calcul d'un écoulement diphasique implique moins d'étapes de calcul pour des suspensions de concentrations élevées [216].

Dans ce chapitre, une géométrie microfluidique de focalisation hydrodynamique (un et deux niveaux) est étudiée numériquement et expérimentalement dans le cas d'écoulement de suspensions de nanoparticules et de cellules (fig.4.1). Cette géométrie permet de positionner les différents flux porteurs de manière contrôlée dans la largeur

du canal principal. Selon la configuration, la distance entre cellules et nanoparticules est contrôlable en modifiant les débits des flux porteurs. À l'aide de la méthode des éléments finis, l'équation du fluide est résolue pour différents paramètres. Le suivi des nanoparticules se fait en considérant des particules ponctuelles suivant les lignes de courant obtenues, ou une espèce chimique de faible diffusion suivant la convection du fluide. Expérimentalement, les puces déjà présentées en Verre-Si-Verre sont utilisées avec les nanoparticules et les cellules d'intérêt pour valider l'approche numérique.

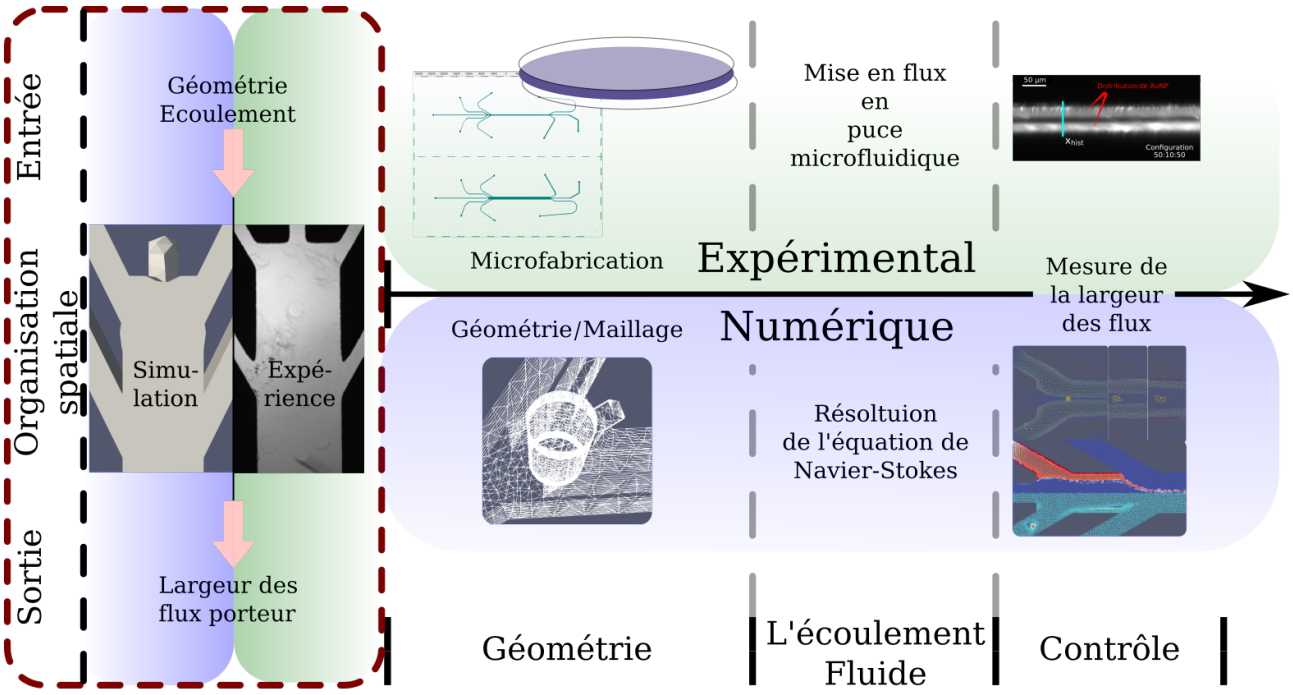


FIGURE 4.1 – **Modélisation et validation du contrôle de nanoparticules en écoulement microfluidique.**
Les études numériques et expérimentales prennent en arguments d'entrée la géométrie et les paramètres de l'écoulement (débit). L'organisation spatiale des particules est mesurée par la largeur des flux (porteurs de nanoparticules). Les deux axes sont menés en parallèle. Dans les deux cas la géométrie est recréée par maillage ou par microfabrication, l'écoulement modélisé ou généré et enfin la distribution de nanoparticules mesurées. Certains paramètres sont uniquement étudiés numériquement notamment la géométrique.

2 Matériels et Méthodes : Focalisation cellules-nanoparticules en écoulement microfluidique

La validation de la méthode d'organisation d'un écoulement bi-phasique se fait numériquement par modélisation en éléments finis de l'écoulement microfluidique. Les phases, nanoparticules ou cellules, sont modélisées selon l'approche par des concentrations discrètes ou des particules ponctuelles dans les lignes de courant. Grâce à une géométrie de focalisation, les nanoparticules et les cellules sont mises en écoulement et la distance entre les deux phases est contrôlée. Des paramètres de géométries et d'écoulement influent sur la distance. L'approche numérique permet d'en dégager les plus intéressants (unicité de la géométrie, variation en temps réel).

La méthode des éléments finis pour la résolution de l'équation du fluide est réalisée sur FreeFem++, un logiciel de simulation numérique [217]. Il permet la résolution d'équations différentielles en multi-physique en deux ou trois dimensions même pour des systèmes non-linéaires. Ce logiciel reste adaptatif à certains phénomènes ou problèmes physiques impliquant plusieurs systèmes physiques couplés. Pour en citer quelques uns à titre d'exemple, FreeFem++ permet d'étudier les interactions fluides-structures, les forces de Lorentz dans le contexte des fonderies d'aluminium et des problèmes océano-atmosphériques.

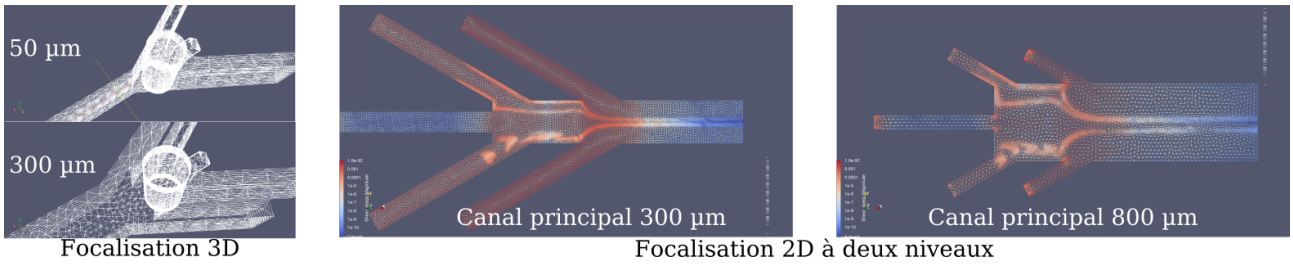
FreeFem++ permet la description du problème, qu'il soit à valeurs réelles ou complexes, par formulation variationnelle pour laquelle nous pouvons avoir accès aux différents éléments de calcul (vecteur, matrice). La géométrie peut être établie analytiquement *via* des courbes paramétrées pour créer un maillage. Ce dernier peut être adaptatif aux variations des fonctions d'intérêt grâce à un matrice Hessienne (matrice de dérivées secondes). Par ailleurs, sur les éléments du maillage (noeuds), le logiciel FreeFem++ effectue des interpolations automatiques de données et enregistre les matrices résultantes pour l'extraction ou l'exploitation des données.

Les puces sont fabriquées à partir d'un assemblage verre-silicium-verre en salle blanche (fig.3.3, Chapitre 3). Le choix de ces matériaux permet la tenue aux hautes pressions (fréquentes pendant les nettoyages) et une très bonne transparence optique dans le visible. Différentes géométries sont testées à angle fixé. Les expériences de contrôle et d'organisation de l'écoulement sont effectuées sur des nanoparticules déjà utilisées et des cellules HeLa.

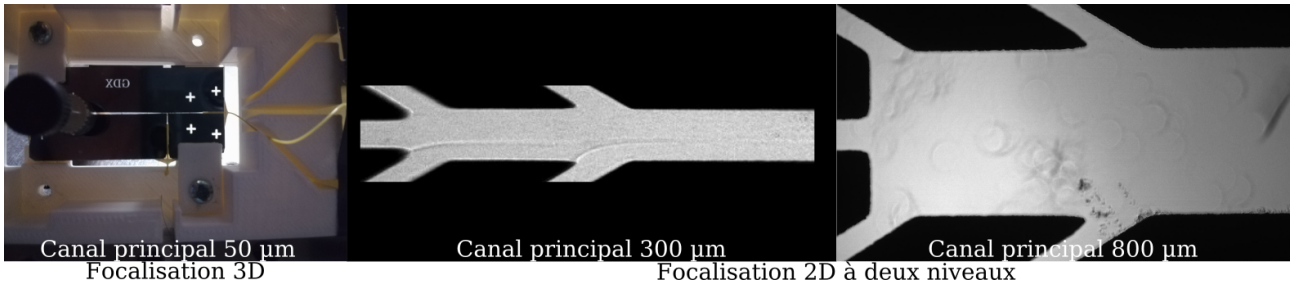
2.1 Géométrie de focalisation et écoulement de particules

La géométrie des puces microfluidiques implémentées numériquement et exploitées expérimentalement se base sur la focalisation hydrodynamique avec une entrée centrale et des entrées latérales symétriques (fig.4.2a). Numériquement, la focalisation est testée en deux dimensions (dans le plan horizontal) avec un et deux niveaux de focalisation mais également en trois dimensions avec des entrées latérales verticales symétriques. Par ailleurs, la forme de la section du canal central est variée entre circulaire et rectangulaire.

Expérimentalement, des puces verre-Si-verre (cf Chapitre 3) sont obtenues par microfabrication (fig.4.2b). Elle dispose de un ou deux niveaux de focalisation en deux dimensions (plan horizontal). Deux profondeurs de canal ($h = 50$ µm et $h = 100$ µm) sont utilisées avec respectivement un canal central de section circulaire (capillaire inséré) et un canal central de section rectangulaire (canal gravé).



(a) Géométries implémentées numériquement



(b) Puce réalisée par microfabrication

FIGURE 4.2 – **Géométries de focalisation hydrodynamique en puce microfluidique.**
Fig.a) Géométries de focalisation étudiées numériquement. Différents paramètres sont étudiés. D'une part, il y a les plans de focalisation et le nombre de niveaux de focalisation. D'autre part, géometriquement, il y a la largeur du canal principal et l'angle entre les entrées et l'axe du canal principal. **b)** Puces microfluidiques obtenues par microfabrication en verre-Si-verre. La focalisation 3D n'est pas exploitée. On s'intéresse expérimentalement uniquement aux effets des débits latéraux dans le plan horizontal.

2.2 Modélisation de l'écoulement en canal microfluidique

La résolution de l'équation de l'écoulement se fait suivant la méthode des éléments finis. Le système de Navier-Stokes instationnaire dans un domaine Ω avec des frontières $\partial\Omega$ s'écrit :

$$\begin{aligned} \partial_t \boldsymbol{u} + \boldsymbol{u} \cdot \nabla \boldsymbol{u} + \nabla p - \nu \Delta \boldsymbol{u} &= 0 \text{ dans } \Omega \\ \nabla \cdot \boldsymbol{u} &= 0 \text{ dans } \Omega \\ \boldsymbol{u}|_{t=0} &= \boldsymbol{u}^0 \\ \boldsymbol{u}|_{\partial\Omega} &= \boldsymbol{u}_{\partial\Omega} \end{aligned}$$

où $\boldsymbol{u}$ est le vecteur vitesse, p la pression, ν la viscosité du liquide et $\boldsymbol{u}^0$ et $\boldsymbol{u}_{\partial\Omega}$ la vitesse initiale et la vitesse de glissement aux bords du domaine Ω respectivement [217].

Les canaux microfluidiques utilisés ont des dimensions de l'ordre de quelques centaines de µm. L'écoulement est considéré Newtonien, laminaire et incompressible. La pesanteur est négligée et des conditions de non-glissement sont appliquées aux conditions de bord (couche limite). La température est estimée constante et égale à la température ambiante [218].

Le système est considéré dans son état stationnaire. En prenant en compte les hypothèses ci-dessus, l'équation de l'écoulement revient donc à considérer le problème de Stokes stationnaire, ne prenant en compte que le gradient de pression, le laplacien rendant compte de la viscosité et l'équation d'incompressibilité. On notera Ω

le domaine et $\partial\Omega$ ses frontières.

$$\begin{cases} \mu\Delta\boldsymbol{u} = \overrightarrow{\text{grad}}\, p - \rho\boldsymbol{f} \quad \forall\vec{x} \in \Omega \\ \text{div}\, \boldsymbol{u} = 0 \quad \forall\vec{x} \in \Omega \\ \boldsymbol{u} = \vec{0} \quad \forall\vec{x} \in \partial\Omega \end{cases} \tag{1}$$

où $\boldsymbol{u}$ le champ vectoriel de vitesse, p le champ scalaire de pression, ρ la masse volumique du fluide, μ la viscosité dynamique du fluide et $\boldsymbol{f}$ le terme source.

L'équation de l'écoulement telle qu'elle est décrite par l'équation 1 est une formulation forte, *i.e.* complète. La résolution du problème de Stokes – trouver $\boldsymbol{u}$ et p telles que l'équation 1 soit vérifiée – se fait numériquement en introduisant la formulation faible ou "variationnelle". Cette dernière nécessite l'introduction de deux fonctions, notées $\boldsymbol{u}_t$ et p_t, des fonctions tests des champs de vitesse et de pression.

Le résidu $R(\vec{x})$ du système. Si R est nul, alors $\boldsymbol{u}$ est la solution exacte. Il est donné par :

$$R(\vec{x}) = \mu\Delta\boldsymbol{u} - \overrightarrow{\text{grad}}\, p + \rho\boldsymbol{f} + \text{div}\, \boldsymbol{u} \tag{2}$$

La minimisation du résidu est réalisée par pondération avec une fonction test w, quel que soit $\vec{x}$ dans Ω, tel que :

$$0 = \int_0^1 R(\vec{x})\ w(\vec{x}) \mathrm{d}\vec{r} \tag{3}$$

Ici, le système d'équation 1 devient :

$$\int_\Omega \nabla\boldsymbol{u}\ \nabla\boldsymbol{u}_t\, \mathrm{d}\boldsymbol{r} - \int_\Omega p\ \nabla\cdot\boldsymbol{u}_t\, \mathrm{d}\boldsymbol{r} + \int_\Omega p_t\, \nabla\cdot\boldsymbol{u}\, \mathrm{d}\boldsymbol{r} = 0 \tag{4}$$

avec $\boldsymbol{u}_t$ et p_t respectivement les fonctions test du champ de vitesse et du champ de pression. Après intégration par partie, il vient :

$$\int_\Omega \nabla p\cdot\nabla\boldsymbol{u}_t\, \mathrm{dV} + \int_\Omega \nabla\boldsymbol{u}\cdot\nabla\boldsymbol{u}_t\, \mathrm{dV} + \int_\Omega \nabla\boldsymbol{u}\, p_t\, \mathrm{dV} = 0 \tag{5}$$

L'algorithme de résolution et des extraits des scripts implémentés sont présentés en annexe G.

2.3 Écoulement multiphasique en régime stationnaire ou dynamique

On considère que les nanoparticules d'or utilisées sont de faible diffusion : $\mathcal{D} = 9.02 \times 10^{-12}$ m^2/s pour des particules d'or de 50 nm de diamètre [219–221]. Il s'agit donc de suivre l'effet de l'écoulement laminaire en milieu microfluidique sur les nanoparticules (fig.4.3a). On considère donc que les particules vont suivre les lignes de courants établies par la résolution du problème de Stokes. Ce comportement peut être reproduit en introduisant des particules virtuelles se propageant dans un écoulement stationnaire. On peut également l'obtenir en considérant une espèce chimique très peu diffusante soumise à la convection dans un écoulement instationnaire, mais en régime permanent (fig.4.3b).

2.3.1 Calcul de phases avec suivi d'écoulement en 2D

La géométrie avec deux étages de focalisation est exploitée pour trois flux d'intérêt injectés par le premier étage de focalisation (fig.4.2 et 4.3a). Le deuxième étage confine l'écoulement des trois flux dans la direction transverse du canal. Les trois flux sont le flux porteur de nanoparticules, le flux central séparateur et le flux porteur de

cellules. Les incréments de débits du flux séparateur à débit total fixé permet le déplacement des cellules par rapport aux nanoparticules.

Le repérage des deux phases (biologique et plasmonique) en deux dimensions se fait en utilisant des espèces chimiques de concentration c qui vont évoluer suivant l'écoulement de Stokes instationnaire (fig.4.3d). Après calcul du champs de vitesse à chaque pas de temps, la concentration est calculée telle que :

$$c^+ = c \circ X$$

X est le champ convecté défini par $X(x) = x_t$ où x_t est la trajectoire d'une particule dans un champ de vitesse stationnaire $\boldsymbol{u}$:

$$\dot{x_t} = u(x_t) \quad \leftrightarrow \quad x_{t=0} = x \tag{6}$$

Cette approche rend compte du terme $\boldsymbol{u}\nabla c$ où c peut prendre une forme continue, *i.e.* renouvelée à chaque pas de temps ou discrète pour distinguer entre deux cellules consécutives.

La distinction des cellules permet, avec la convection, de repérer facilement la position d'une cellule suivant l'écoulement. La position gardée en mémoire est exploitée pour extraire les grandeurs fluidiques et en calculer les différentes contraintes de cisaillement. Ces résultats sont alors injectés dans un système d'équations d'élasticité pour estimer la déformation que peuvent subir les cellules dans une géométrie microfluidique donnée.

2.3.2 Calcul pas à pas de la trajectoire pour une suspension de particules

La configuration avec gaine de nanoparticules vise à exploiter la focalisation hydrodynamique pour contrôler la distance des nanoparticules par rapport au centre du canal. L'injection des cellules par le canal central les positionne au centre du canal principal. La modification de la largeur des flux porteurs de nanoparticules, et donc de cellules, varie la distance entre le front de génération de nano-bulles de vapeur et les membranes cellulaires. La mise en écoulement de nanoparticules par les entrées latérales du système de focalisation implique donc un suivi de leur position initiale, jusqu'à une position dans le canal principal, après l'étage de focalisation. Les nanoparticules sont considérées comme des objets ponctuels suivant les lignes de courant (fig.4.3c).

Schéma d'Euler au premier ordre en deux dimensions

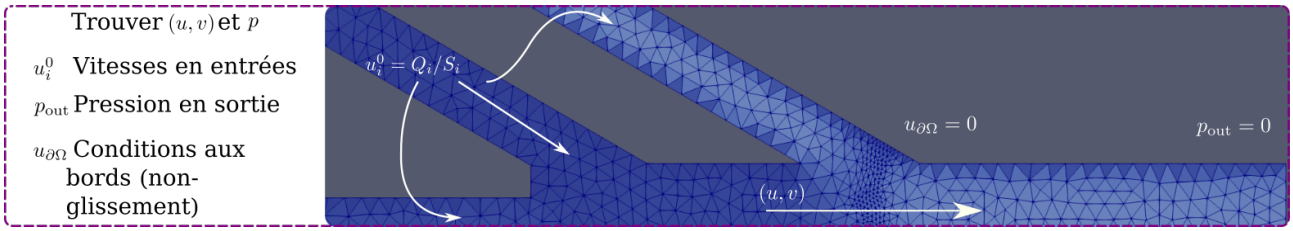
Des particules virtuelles, initialement le long de l'axe perpendiculaire d'un canal d'entrée, sont propagées le long des lignes de courant suivant :

$$\frac{d\vec{r}}{dt} = \vec{u} \implies \begin{cases} \dfrac{dx}{dt} = u_x \\ \dfrac{dy}{dt} = u_y \\ \dfrac{dz}{dt} = u_z \end{cases} \quad \leftrightarrow \quad \begin{cases} dx = u_x\ dt \implies dt = \dfrac{dx}{u_x} \\ dy = u_y\ dt \\ dz = u_z\ dt \end{cases} \quad \text{ou} \quad \begin{cases} x_{k+1} - x_k = dx \\ y_{k+1} - y_k = dy \\ z_{k+1} - z_k = dz \\ t_{k+1} - t_k = dt \end{cases} \tag{7}$$

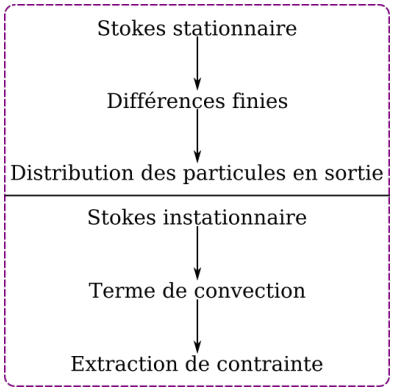
Le problème revient ainsi à considérer le système suivant à chaque itération :

$$\begin{cases} x_{k+1} = x_k + \mathrm{d}x \\ t_{k+1} = t_k + \dfrac{\mathrm{d}x}{u} \end{cases} \quad \text{et} \quad \begin{cases} y_{k+1} = y_k + \dfrac{v}{u}\mathrm{d}x \\ z_{k+1} = z_k + \dfrac{w}{u}\mathrm{d}x \end{cases} \tag{8}$$

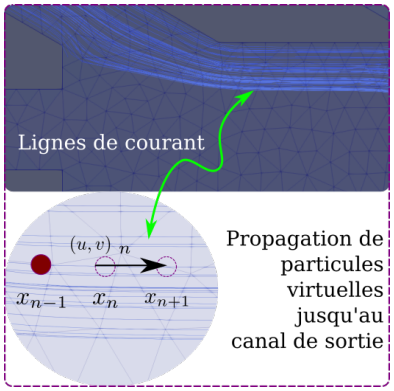
Il s'agit d'une approche statique que l'on peut comparer au lancement de particules individuelles de différents endroits en entrée et relever leur position à une abscisse dans le canal de sortie. Expérimentalement, on pourrait comparer cette méthode à une solution de AuNP en suspension diluée à l'infini.



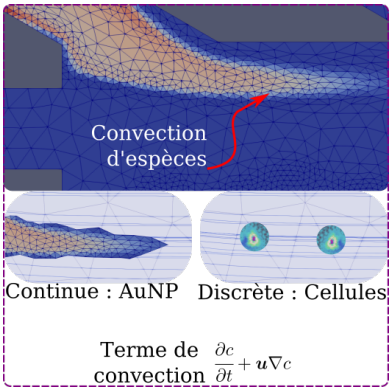
(a) Résolution dans le domaine de la puce microfluidique



(b) Stratégies multiphasiques



(c) Calcul par différences finies



(d) Calcul par convection

FIGURE 4.3 – **Modélisation d'un écoulement bi-phasique dans une puce microfluidique donnée.** La géométrie prise en exemple est une puce microfluidique à deux niveaux de focalisation à deux dimensions. Les mêmes démarches sont appliquées dans le cas d'une géométrie avec une focalisation en trois dimensions. **Fig.a)** L'équation du flux (problème de Stokes stationnaire) est résolue en établissant des conditions aux bords. Au niveau des parois des canaux, la vitesse est nulle (non-glissement). La pression est imposée nulle à la sortie du canal. En entrée, les vitesses sont fixées en fonction des débits désirés. **Fig.b)** Deux approches sont utilisées ici pour déterminer le comportement d'une suspension en écoulement dans la géométrie de focalisation hydrodynamique. En se plaçant dans l'état stationnaire, les trajectoires des lignes de courant sont relevées en utilisant des particules virtuelles et des schémas aux différences finies. Dans le régime instationnaire, des espèces aux concentrations fixées et aux faibles coefficients de diffusion sont injectées par les entrées d'intérêt pour suivre le comportement, et ce pour différentes configurations de débits – en terme de séparation ou de contraintes mécaniques. **Fig.c)** Utilisation de schémas aux différences finies pour reconstruire la trajectoire de particules virtuelles lancées à partir d'une entrée et propagées le long des lignes de courant. À chaque itération, la particule est déplacée suivant x d'une quantité $\mathrm{d}x$ dépendant de la norme de la vitesse. Les pas dans les autres directions sont déterminés par les composantes des vitesses respectives. Les particules sont propagées jusqu'à la section de mesure dans le canal principal pour établir un histogramme de position dans la direction perpendiculaire à l'écoulement (axe y). **Fig.d)** Repérage des suspensions de nanoparticules (AuNP) ou de cellules grâce à des espèces chimiques en convection par l'écoulement microfluidique. En considérant la faible diffusion, des espèces continues (AuNP) ou discrètes (cellules) sont suivies en écoulement instationnaire. Le but est de repérer la position de ces deux phases pour affiner le maillage et déterminer les contraintes fluidiques que peuvent subir les cellules en écoulement. Il est par ailleurs possible de varier les débits d'entrée pour établir le comportement fluidique des deux phases rapidement.

Le système 8 est un schéma d'Euler aux différences finies à l'ordre 1. Ce schéma permet de construire pas à pas la position de particules virtuelles suivant les lignes de champ de vitesse. Le terme correctif rajouté aux coordonnées à l'instant k est en fait la distance parcourue pendant un pas de temps dt. Ramener le problème à un pas dx permet de limiter les calculs et de s'affranchir de la composante temporelle.

Cette approche avec ce schéma particulier de différences finies s'avère plus adéquate pour les calculs en deux qu'en trois dimensions. L'extrusion de la géométrie pour la 3D nécessite un ordre de précision supplémentaire lors de la transition d'un point $\vec{r}_k$ au point suivant $\vec{r}_{k+1}$. En effet, le pas adaptatif utilisé renvoie dans certains cas des erreurs de trajectoire qui entraînent les particules virtuelles en dehors du domaine de calcul Ω.

Méthode de Runge-Kutta d'ordre 4 en trois dimensions

La méthode de Runge-Kutta consiste à utiliser la méthode de Simpson (parabole passant par les points extrêmes et le point milieu) au lieu d'utiliser la méthode des trapèzes (schéma d'Euler par exemple) :

$$\int_a^b f(x)\mathrm{d}x \approx \frac{b-a}{6}\left[f(a) + 4f(\frac{a+b}{2})f(b)\right] \tag{9}$$

Soit un problème du type :

$$\frac{\mathrm{d}y}{\mathrm{d}t} = f(y,t)$$

On peut écrire :

$$y(t_{n+1}) - y(t_n) = \int_{t_n}^{t_n+h} f(t,y(t))\mathrm{d}t \quad \text{où } h \text{ est le pas de calcul}$$

En utilisant l'expression 9, il vient :

$$\int_{t_n}^{t_n+h} f(t,y(t))\mathrm{d}t = \int_{t_n}^{t_{n+1}} f(t,y(t))\mathrm{d}t \simeq \frac{h}{6}\left[f(t_n) + 4f(t_{n+1/2}) + f(t_{n+1})\right]$$

Plus précisément :

$$y_{n+1} = y_n + \frac{h}{6}\left[f(t_n,y_n) + 4f(t_{n+1/2},y_{n+1/2}) + f(t_{n+1},y_{n+1})\right] \tag{10}$$

Les termes en $n+1/2$ et $n+1$ seront estimés à l'aide des points n et du pas h en rendant le schéma explicite. On peut poser :

$$\begin{cases} y^a_{n+1/2} = y_n + \dfrac{h}{2}f(t_n,y_n) \\ y^b_{n+1/2} = y_n + \dfrac{h}{2}f(t_{n+1/2},y^a_{n+1/2}) \end{cases}$$

Par conséquent :

$$\begin{aligned} k_1 &= f(t_n,y_n) \\ k_2 &= f(t_n + h/2, y_n + \frac{h}{2}k_1) \\ k_3 &= f(t_n + h/2, y_n + \frac{h}{2}k_2) \\ k_4 &= f(t_n + h, y_n + hk_3) \end{aligned} \tag{11}$$

viennent définir les termes de l'équation :

$$y_{n+1} = y_n + \frac{h}{6}[k_1 + 2k_2 + 2k_3 + k_4] \tag{12}$$

La même démarche s'applique à la direction z. L'adaptation du pas est également possible dans ce schéma en estimant l'erreur de calcul. Posons par exemple $\tilde{y}_{n+1}$ la solution exacte en deux dimensions, y_1 et y_2 les solutions approximatives en $x_n + h$ et $x_n + h/2$ respectivement, estimée avec un schéma Runge-Kutta 4 avec la relation 12. On peut alors écrire :

$$\begin{aligned} \tilde{y}_{n+1} =& y_1 + Ch^{p+1} + \mathcal{O}(h^{p+2}) \\ \tilde{y}_{n+1} =& y_2 + 2C\left(\frac{h}{2}\right)^{p+1} + \mathcal{O}(h^{p+2}) \end{aligned} \tag{13}$$

Ce qui implique :

$$|y_1 - y_2| = Ch^{p+1}(1 - \frac{1}{2^p}) \Rightarrow C = \frac{|y_1 - y_2|}{h^{p+1}(1 - \frac{1}{2^p})} \tag{14}$$

En injectant la relation de C dans l'équation avec y_2, on peut écrire :

$$\tilde{y}_{n+1} = y_2 + \frac{|y_1 - y_2|}{2^p - 1} + \mathcal{O}(h^{p+2}) \tag{15}$$

Notons $\epsilon = \dfrac{|y_1 - y_2|}{2^p - 1}$. Nous allons utiliser cette estimation de l'erreur et la comparer à l'erreur désirée ϵ_0 :

$$h' = h\left(\frac{\epsilon_0}{\epsilon}\right)^{1/(p+1)} \tag{16}$$

L'utilisation de ce schéma d'ordre supérieur permet de gagner en précision lors de la propagation de particules dans le cas des géométries en trois dimensions.

2.4 Mesure et analyse : suivi des écoulements microfluidiques

La distribution de particules virtuelles, le long de l'axe perpendiculaire à l'écoulement (Oy) dans le canal de sortie, est caractérisée en largeur en fonction du rapport entre débit du flux porteurs d'intérêt et le débit total restant (fig.4.4a). La distribution est représentée avec un histogramme de position suivant des catégories de largeur 1 µm. La largeur est délimitée par les catégories contenant au minimum 2% du nombre initial de nanoparticules pour écarter les trajectoires aberrantes. Cette valeur de largeur est à comparer avec les observations expérimentales effectuées sur une géométrie test implémentée numériquement.

Le suivi de l'écoulement de particules – nanoparticules d'or ou cellules – se fait avec un système d'imagerie en fluorescence ou en lumière blanche. Les suspensions sont préparées à partir des solutions mères diluées dans de l'eau dé-ionisée pour les nanoparticules ou du tampon de phosphate salin pour les cellules. L'écoulement dans la puce est contrôlé par les débits après asservissement des unités de pressions.

Le système et l'appareillage fluidique est identique à celui introduit dans le Chapitre 3. Après établissement du

régime permanent (parcours du volume mort entre le réservoir et la puce), des séquences d'images sont prises en émission pour des suspensions de nanoparticules ($\varnothing$ $20 - 70 - 100$ nm) et des solutions de Rhodamine 110 (excitation à 490 nm et émission à 520 nm). Pour les nanoparticules non fonctionnalisées, l'imagerie se fait en dispersion de la lumière blanche en champs obscur ("dark field"). Les cellules sont imagées par simple lumière blanche pour confirmer l'organisation dans l'axe de l'écoulement de ces dernières. Elles sont également exploitées pour déterminer la vitesse de l'écoulement dans la puce microfluidique aux débits de travail.

Les séquences d'images sont moyennées pour lissage et les profils d'intensités sont caractérisés par les valeurs maximales et leurs positions. Pour chaque jeu de débits en entrées, la largeur du flux porteur d'intérêt est mesurée à mi-hauteur du pic d'intensité.

3 Résultats et Discussion : organisation spatiale des écoulements

La focalisation hydrodynamique a été présentée dans le Chapitre 3 dans le but d'organiser la suspension de cellules et de nanoparticules par rapport à la zone d'irradiation par le laser Q-switch. La forme elliptique du faisceau laser nécessite le confinement du flux porteur central le long du grand axe. La focalisation est alors faite empiriquement pour correspondre à la zone de plus forte fluence, à savoir le centrage du flux d'intérêt (central) et la réduction de sa largeur à la taille caractéristique de cellules HeLa en suspension. La configuration obtenue est maintenue pendant l'irradiation. L'approche microfluidique présentée dans ce chapitre se base sur cette même géométrie. En revanche, il est question de l'organisation de l'écoulement, mais aussi de son contrôle direct.

L'exploitation de la focalisation hydrodynamique dépend de paramètres géométriques et fluidiques. Le premier type concerne les dimensions de la puce microfluidique utilisée comme l'angle entre les canaux latéraux et le canal central, la largeur de ces derniers ou le nombre de niveaux de focalisation. Le deuxième type correspond aux vitesses des flux porteurs et d'autres paramètres physiques comme la densité. Dans le cas d'une application biologique, les liquides tampons sont généralement aqueux et de masse volumique proche de celle de l'eau. L'intérêt de l'approche numérique préliminaire est l'évaluation de l'influence des différents paramètres, particulièrement géométriques, pour orienter en amont l'étape de microfabrication des puces microfluidiques.

À partir d'une géométrie test, des simulations sont effectuées pour dégager les paramètres les plus influents sur le comportement du flux avec une géométrie de focalisation hydrodynamique. Cette même géométrie est étudiée expérimentalement pour valider l'approche numérique. Cette dernière est ensuite exploitée pour introduire et dimensionner de nouvelles géométries au vue de la microfabrication. Les puces obtenues sont enfin testées fluidiquement.

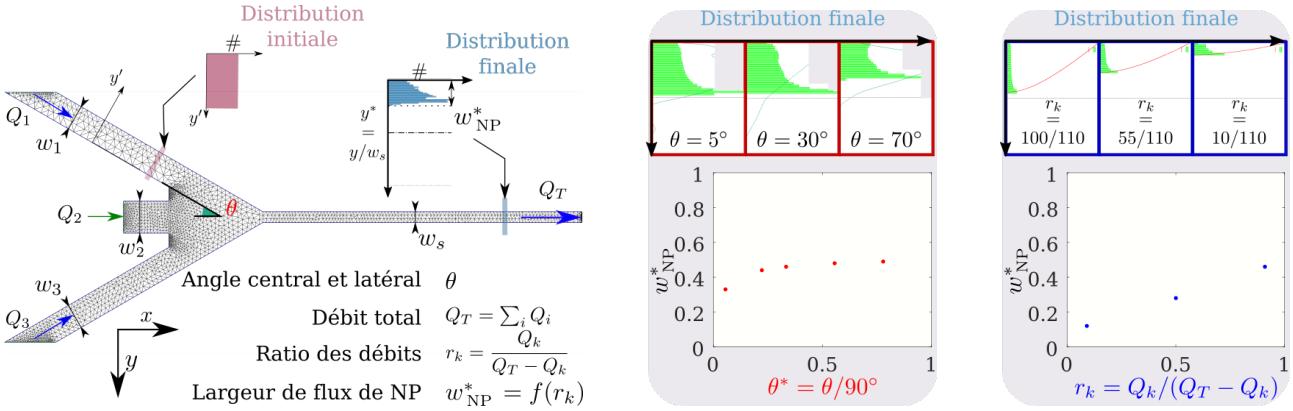
3.1 Contrôle avec un niveau de focalisation hydrodynamique

Une géométrie avec un niveau de focalisation et un canal central de 50 µm de large est implémentée dans le logiciel de modélisation par éléments finis. L'approche pas-à-pas est adoptée pour modéliser le comportement de nanoparticules en écoulement. Deux paramètres, l'angle entre le canal central et les canaux latéraux et le rapport des débits sont étudiés. Expérimentalement, des suspensions de nanoparticules sont mises en flux dans une puce microfluidique de géométrie identique et suivies optiquement. Les distributions des nanoparticules dans l'axe perpendiculaire du canal obtenues numériquement et expérimentalement sont comparées.

3.1.1 Influence du débit sur la focalisation dans le plan horizontal

Après la résolution du système de Stokes pour un écoulement stationnaire, l'équation 8 basée sur un schéma aux différences finies de type Euler est appliquée à partir d'une entrée de la puce microfluidique. Arbitrairement, une des entrées latérales a été choisie pour représenter l'arrivée des nanoparticules pour former une gaine autour du canal central porteur des cellules (fig. 4.4a). Mathématiquement, 2500 points sont choisis le long d'une section droite du canal d'entrée (axe y') comme position initiale. Pour chaque point, la ligne de courant est reconstruite à chaque pas de temps en propageant une particule virtuelle suivant le vecteur vitesse. Une condition sur la position (mi-parcours dans le canal principal) permet de passer à l'itération suivante pour réaliser la même opération sur une particule virtuelle partant d'une autre position.

Pour chaque particule propagée, l'ordonnée à la position d'arrivée est enregistrée et normée par la largeur w_s du canal de sortie (y^* adimensionnée). En parcourant toute la largeur du canal d'entrée, les particules



(a) Démarche numérique sur une géométrie test (b) Influence de l'angle θ (c) Influence du rapport r_k

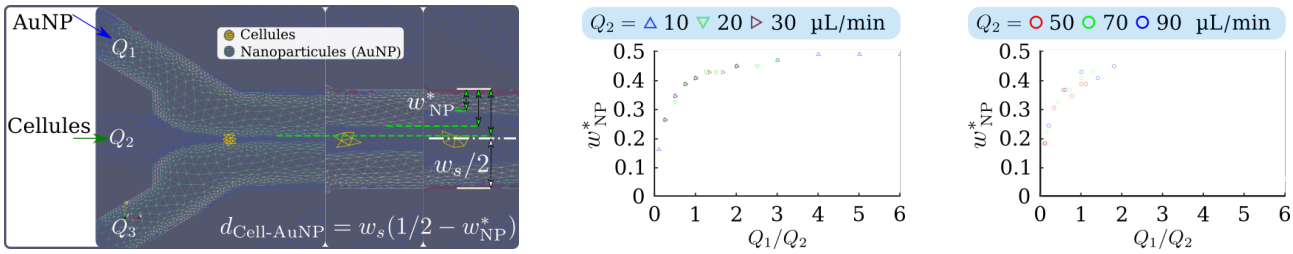
FIGURE 4.4 – **Influence des paramètres de géométries et de flux sur la distribution finale de nanoparticules.**
La géométrie étudiée ici est une puce de canal central de 50 µm de large avec un niveau de focalisation. Les largeurs et débits des entrées sont notées w_i et Q_i $\forall i \in \{1,2,3\}$. **Fig.a)** Démarche numérique pour la description de la distribution de particules virtuelles dans le canal de sortie. À partir d'une distribution de points uniformes au départ du canal d'entrée de largeur w_1 (Distribution initiale en rouge) le long de l'axe y', les trajectoires sont reconstruites suivant les lignes de flux jusqu'au canal principale de largeur w_s. La distribution finale (bleue) le long de l'axe y est caractérisée par sa largeur adimensionnée $w^*_{NP} = w_{NP}/w_s$. L'angle entre les entrées centrale et latérale (soit l'angle entre y et y') est noté θ. $Q_T = \sum_i Q_i$ est le débit total soit le débit dans le canal principal. La description des débit se fait par le paramètre r_k, le rapport entre débit d'intérêt Q_k et la somme des débits restants, soit $Q_T - Q_k$. **Fig.b)** Le paramètre adimensionné $\theta^* = \theta/90°$ correspondant à l'angle θ est varié numériquement pour évaluer son influence. En haut de la figure sont représentés les histogrammes construits pour la distribution finale à la sortie de la puce microfluidique pour différentes valeurs d'angle. **Fig.c)** Le paramètre de flux r_k, rapport des débits, est varié numériquement également. En haut de la figure sont représentés les histogrammes construits pour la distribution finale à la sortie de la puce microfluidique pour différents débits d'entrée. La variation des débits est plus influente que le paramètre d'angle et offre l'avantage d'être modifiable en temps réel sans changer de puce.

virtuelles se distribuent dans le canal de sortie et un histogramme du nombre de nanoparticules est tracé en fonction de la position y^*. La largeur de la distribution finale w^*_{NP} est donc la largeur de la distribution de nanoparticules dans une section droite du canal principal. Cette grandeur de sortie est alors évaluée par rapport à un des paramètres d'entrée, l'angle ou le ratio r_k.

À débits d'entrée fixés, l'angle entre le canal central et le canal latéral, noté θ^*, est modifié en maintenant les largeurs de canaux constantes. L'autre paramètre d'entrée mesure les débits d'injection des différents fluides porteurs dans la puce microfluidique. Le ratio r_k est le rapport entre le $k^{\text{ème}}$ débit, ici Q_1, et la somme des débits restants donc $Q_2 + Q_3$ (fig. 4.4b). Multiplier l'angle d'un facteur 14 permet d'élargir la distribution finale par un facteur 1.5. De façon plus marquante, multiplier le rapport de débit par 14 permet d'élargir la distribution d'un facteur ~ 5 (fig. 4.4c). D'une part, le débit est plus influent que l'angle entre les entrées pour modifier la distribution d'entrée. D'autre part, l'appareillage microfluidique et ses unités de contrôles permettent de modifier la distribution initiale directement en faisant varier le rapport entre débit du flux d'intérêt par rapport au débit total.

3.1.2 Déplacement du front de nanoparticules avec le rapport des débits latéraux

Dans la configuration de la focalisation hydrodynamique à un niveau, le contrôle de la largeur du flux porteur de nanoparticules w^*_{NP} revient à contrôler la distance séparant l'interface entre les flux porteurs des intermédiaires plasmoniques et le centre du canal (fig.4.5a). Dans le cas où le flux central est porteur d'une suspension de cel-



(a) Définition de la distance $d_{\text{Cell-AuNP}}$ entre cellule et front de nanoparticules

(b) Largeur du flux AuNP pour des petits débits centraux

(c) Largeur du flux AuNP pour des grands débits centraux

FIGURE 4.5 – **Contrôle de la position des nanoparticules par rapport aux cellules.**
L'organisation et le contrôle des nanoparticules visent à définir et contrôler la distance entre la suspension de cellules en écoulement injectée *via* le canal central et le flux porteur de la suspension de nanoparticules d'or (AuNP). Cette distance est notée $d_{\text{Cell-AuNP}}$. Des simulations en deux dimensions sont effectuées dans le cas de la géométrie test présentée plus haut **Fig.a)** Approche schématique de la simulation de la distance entre cellules et nanoparticules. La focalisation de la suspension de cellules se fait de manière symétrique, *i.e.* les débits des flux latéraux sont égaux ($Q_1 = Q_3$). Pour différentes valeurs du débit central Q_2, porteur des cellules, la largeur du flux porteur de nanoparticules $w^*_{\mathrm{NP}} = w_{\mathrm{NP}}/w_s$ est mesurée. **Fig.b,c)** Évolution de la largeur adimensionnée w^*_{NP} en fonction du rapport entre les débits latéral et central Q_1/Q_2. Quelle que soit la valeur du débit central, les courbes ont la même allure.

lules, la distance $d_{\text{Cell-AuNP}}$ entre les cellules visées par la photoporation et les sites de génération de nano-bulles de vapeur est alors reliée à la largeur w^*_{NP}.

La largeur w^*_{NP} évolue pour les valeurs de Q_1/Q_2 croissantes (fig.4.5b et c). Ce rapport peut être ramené au rapport r_k introduit fig.4.4 en posant, dans le cas d'une focalisation symétrique ($Q_1 = Q_3$) :

$$r_k = \frac{Q_1}{Q_1 + Q_2} = \frac{Q_1}{Q_2}\frac{1}{\frac{Q_1}{Q_2} + 1} \tag{17}$$

ou encore :

$$\frac{Q_1}{Q_2} = \frac{r_k}{1 - r_k} \tag{18}$$

Qualitativement, quelle que soit la valeur du débit central ($Q_2 \in [10 : 90]$), la largeur w^*_{NP} suit la même tendance par rapport au ratio Q_1/Q_2 et donc par rapport à r_k. Cependant, il apparaît pour des débits centraux supérieurs ou égaux à ~ 50 µl/min que $Q1/Q_2 \sim 1$, soit $r_k \sim 0.5$, marque le début de points dispersés (fig.4.5c). Dans ces gammes, le débit total obtenu est $Q_T \geq 150$ µl/min. Les variations de maillages pendant la résolution de l'équation de l'écoulement influe alors sur l'étape de calcul de la trajectoires le long des lignes de courant, introduisant ainsi une variabilité.

3.1.3 Description analytique de la focalisation et exploitation du flux porteur de nanoparticules

Pour décrire quantitativement la dynamique et l'évolution de la largeur w^*_{NP} et par conséquent de la distance $d_{\text{Cell-AuNP}}$, il faut considérer l'approche utilisée dans le cas de la focalisation hydrodynamique en cytométrie en flux, établie en se basant sur la théorie de l'écoulement potentiel [218, 222]. Soit une géométrie de focalisation à un niveau avec trois entrées de largeur w_i $\forall i \in \{1, 2, 3\}$ avec un flux porteur central ($i = 2$) et deux liquides porteurs (fig.4.6).

Par conservation de la masse, la quantité de fluide tranversant une section du canal central doit être égale

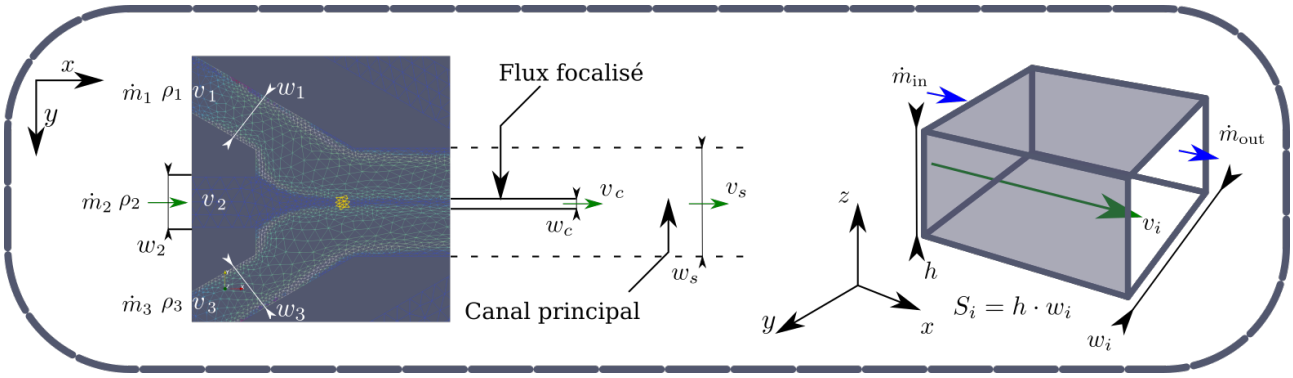


FIGURE 4.6 – **Focalisation hydrodynamique (notations).**
On considère une géométrie de focalisation à section rectangulaire et à un niveau avec des entrées de largeurs w_1, w_2 et w_3. Le canal principal (de sortie) est de largeur w_s. Les flux entrant, de masses volumiques ρ_1, ρ_2 et ρ_3 sont injectés par les entrées respectives avec des débits massiques $\dot{m}_1$, $\dot{m}_2$ et $\dot{m}_3$ correspondant à des vitesses moyennes $\bar{v}_1$, $\bar{v}_2$ et $\bar{v}_3$. On considère que la puce microfluidique étudiée est de profondeur h uniforme telle que pour toute section S_i on peut écrire $S_i = w_i \cdot h$. Le flux focalisé, ici en central, est décrit par sa largeur w_c, sa section S_c et sa vitesse v_c.

à la quantité transportée par le flux central après focalisation. Par conservation du débit, on peut écrire :

$$\bar{v}_2 \cdot S_2 = v_c \cdot S_c \tag{19}$$

$\bar{v}_2$ et v_c sont respectivement la vitesse moyenne du fluide dans le canal central et la vitesse du fluide focalisé dans le canal principal. S_2 et S_c sont les sections du flux central entrant et du flux focalisé. Pour une même profondeur de canal h, la section est définie par $S_i = w_i \cdot h$ où w_i la largeur de chaque flux. La conservation du débit renvoie alors :

$$w_{\text{c}} = w_2 \frac{\bar{v}_2}{v_c} \tag{20}$$

En se plaçant en régime laminaire et en négligeant la diffusion entre chaque flux introduit dans l'étage de focalisation, la conservation de la masse renvoie :

$$\dot{m}_{\text{in}} = \rho_1 \bar{v}_1 w_1 + \rho_2 \bar{v}_2 w_2 + \rho_3 \bar{v}_3 w_3 \quad \text{et} \quad \dot{m}_{\text{out}} = \rho_s \bar{v}_s w_s \tag{21}$$

Les indices 1, 2 et 3 renvoient aux entrées de l'étage de focalisation et l'indice s renvoie au canal principale en aval de la focalisation. L'égalité de ces deux expressions par conservation de la masse renvoie alors l'expression de la vitesse dans le canal de sortie :

$$\bar{v}_s = \frac{\rho_1 \bar{v}_1 w_1 + \rho_2 \bar{v}_2 w_2 + \rho_3 \bar{v}_3 w_3}{\rho_s w_s} \tag{22}$$

Pour un écoulement laminaire stationnaire, le profile de vitesse est parabolique. Par conséquent, la vitesse au centre du flux focalisé $v_c = \alpha \bar{v}_s$ avec α un réel positif. La largeur du flux focalisé est donc donnée par :

$$\begin{aligned} w_c &= w_2 \frac{\bar{v}_2}{\bar{v}_c} = w_2 \frac{\bar{v}_2}{\alpha \bar{v}_s} \\ &= \frac{\rho_s \bar{v}_2 w_s w_2}{\alpha(\rho_1 \bar{v}_1 w_1 + \rho_2 \bar{v}_2 w_2 + \rho_3 \bar{v}_3 w_3)} \end{aligned}$$

$$\frac{w_c}{w_s} = \frac{\rho_s}{\alpha(\rho_1 \frac{\bar{v}_1 w_1}{\bar{v}_2 w_2} + \rho_2 \frac{\bar{v}_2 w_2}{\bar{v}_2 w_2} + \rho_3 \frac{\bar{v}_3 w_3}{\bar{v}_2 w_2})}$$

En posant :

$$\frac{w_c}{w_s} = w_c^* \quad , \quad \frac{w_i}{w_2} = \beta_i \quad \text{et} \quad \rho_s = \rho_i = \rho \quad \forall i \in \{1,2,3\} \tag{23}$$

Il vient alors :

$$w_c^* = \frac{1}{\alpha(1 + \beta_1 \frac{\bar{v}_1}{\bar{v}_2} + \beta_3 \frac{\bar{v}_3}{\bar{v}_2})} \tag{24}$$

Par ailleurs, la vitesse moyenne peut être exprimée par rapport au débit volumique Q_i telle que $\bar{v}_i = Q_i/S_i$ avec $S_i = w_i h_i$ la section du flux supposée rectangulaire et $\forall i \in \{1,2,3\}$. En considérant que les canaux ont la même profondeur h, le ratio pour le $k$ième débit $r_k = Q_k/(Q_T - Q_k)$ peut s'écrire :

$$r_k = \frac{\bar{v}_k S_k}{\sum_{i=1}^{N} \bar{v}_i S_i - \bar{v}_k S_k} = \frac{\bar{v}_k w_k}{\sum_{i=1}^{\{1,2,3\}} \bar{v}_i w_i - \bar{v}_k w_k} \tag{25}$$

en faisant l'approximation que $Q_i = \iint v_i dS_i \approx \bar{v}_i \cdot S_i$. Pour le ratio du débit central par exemple ($k = 2$) :

$$r_2 = \frac{\bar{v}_2}{\bar{v}_1 \frac{w_1}{w_2} + \bar{v}_3 \frac{w_3}{w_2}} \tag{26}$$

On reprend alors l'expression des rapport de largeur β_i. L'inverse de cette relation donne ensuite :

$$\frac{\beta_1 \bar{v}_1 + \beta_3 \bar{v}_3}{\bar{v}_2} = \frac{1}{r_2} \tag{27}$$

Tout en s'affranchissant des paramètres de dimensions des canaux d'entrée, l'expression de la largeur du flux focalisé s'écrit enfin comme :

$$w_c^* = \frac{1}{\alpha(1 + 1/r_2)} = \frac{r_2}{\alpha(r_2 + 1)} \tag{28}$$

Ce cas particulier où le canal central ($i = 2$) est pris en argument peut ainsi être élargi aux autres entrées. Appliqué à la largeur w_{NP}^*, on peut par conséquent poser que :

$$d_{\text{Cell-AuNP}} = w_c(1/2 - w_{\mathrm{NP}}^*) = w_c \left(1/2 - \frac{r_k}{\alpha(r_k + 1)}\right) \quad \text{avec } \alpha \in \mathrm{IR} \quad \text{et } k \text{ l'indice de l'entrée choisie}$$

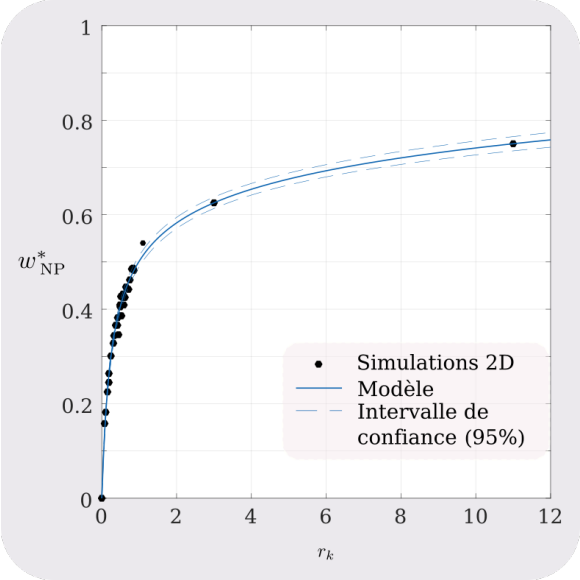
Les simulation en deux dimensions effectuées sur une géométrie avec un canal principal de 50 µm de large (fig.4.4) sont analysées de façon à extraire la largeur du flux porteur de nanoparticules w_{NP}^* pour différentes valeurs du rapport r_k, sachant que les gammes de débits influent très peu sur le résultats (fig.4.5). Les résultats sont approchés avec le modèle de l'équation (28) (fig.4.7).

Le coefficient α est introduit pour relier la vitesse moyenne dans le canal de sortie v_s et la vitesse dans le flux confiné. Dans le cas d'un flux porteur au centre du canal avec un profil de vitesse parabolique, il est égal

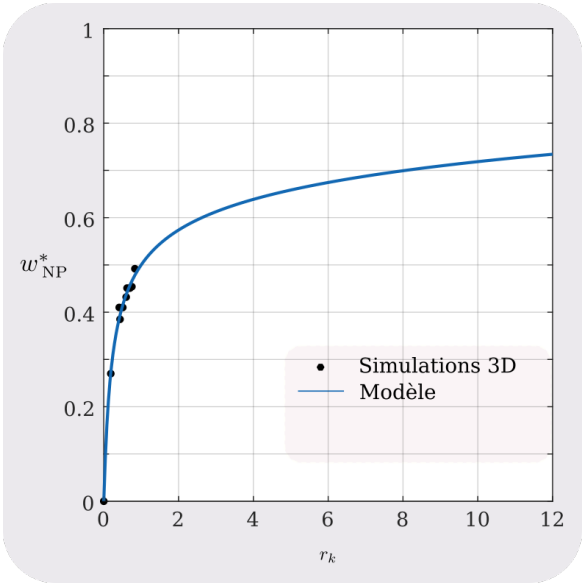
à $\alpha = 1.5$ [218]. L'application du modèle à des entrées latérales implique que ce coefficient doit s'adapter à la position par rapport au profil de vitesse et dépend par conséquent du rapport r_k. Par ailleurs, l'intégration des vitesses pour l'obtention des débits dans l'équation (25) est également une approximation ($Q_i = \iint v_i dS_i \approx \bar{v}_i \cdot S_i$). L'expression de r_k en fonction des vitesses moyennes (équation 27) est source de variabilité. Par conséquent, des degrés de libertés ($a, b, c, d \in \mathrm{IR}$) sont ainsi définis pour l'approximation du modèle :

$$f(r_k) = \frac{a \cdot r_k^c}{b \cdot r_k + d} \tag{29}$$

Le paramètre $d = 1$ est fixée et les autres paramètres sont utilisés comme coefficient pour l'approximation des



(a) Adaptation du modèle $f(r_k) = \frac{a \cdot r_k^c}{b \cdot r_k + 1}$ en 2D



(b) Adaptation du modèle $f(r_k) = \frac{a \cdot r_k^c}{b \cdot r_k + 1}$ en 3D

FIGURE 4.7 – **Approximation des résultats numériques pour la largeur w^*_{NP} par l'équation (28).** Les courbes de tendances suivent la fonction (29). **Fig.4.7a)** Approximation des résultats numériques en deux dimensions telle que $f(r_k) = a \cdot r_k/(b \cdot r_k + d)$ où $d = 1$. Il renvoie $a \sim 3.56 \pm 0.35$, $b = 6.10 \pm 0.74$ et $c = 1.11 \pm 0.01$. L'introduction de coefficients supplémentaires dépendant de r_k permet d'inclure des points à haut rapport de débit. **Fig.4.7b)** Approximation des résultats numériques en trois dimensions telle que $f(r_k) = a \cdot r_k/(b \cdot r_k + d)$ où $d = 1$. Il renvoie $a \sim 4.1$, $b = 7.3$ et $c = 1.1$.

valeurs de w^*_{NP} obtenues numériquement.

La fonction (29) est appliquée au comportement des particules virtuelles suivies en simulations en deux dimensions avec les coefficients ajustés (fig.4.7a). Le coefficient a correspond à $1/\alpha$ qui donne $v_c = 0.28\bar{v}_s$. La valeur est inférieure dans le cas où le flux est central parce que la position latéral occupe la partie à faible vitesse sur le profil parabolique. Les coefficients b et c interviennent dans la conversion d'une relation de vitesse à une relation de débit *via* l'intégration sur une section du fluide ($Q_i = \iint v_i dS_i \approx \bar{v}_i \cdot S_i$) mais aussi dans la position sur le profil de vitesse. Les valeurs obtenues sont éloignées de l'unité (éq. (28)). Cela peut être expliqué par la non prise en compte de l'angle entre canal central et latéral puisque l'influence est certes faible sur la largeur des flux focalisés mais existe néanmoins.

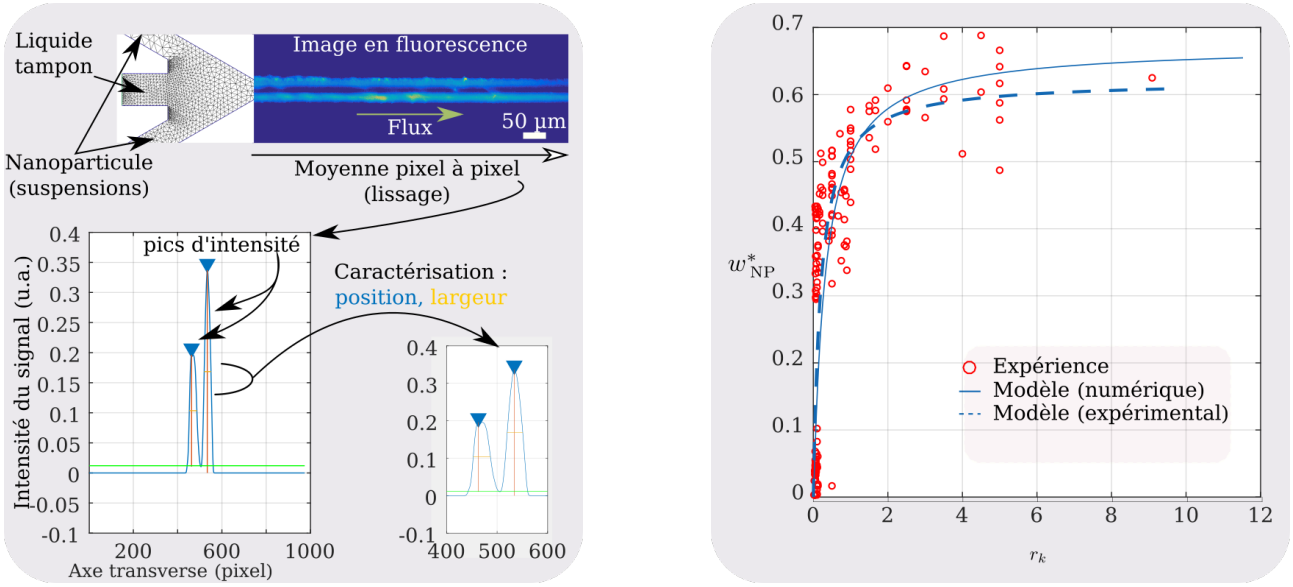
Imposer la contrainte $d = 1$ en lieu et place du coefficient c permet d'inclure les valeurs r_k supérieures. À noter que la dispersion des points autour de la courbe de tendance peut s'expliquer par des variabilités au

niveau du maillage pendant l'étape d'adaptation de la résolution de l'équation de l'écoulement. Elle peut également être générée pendant l'étape d'extraction des valeurs et son seuil de détection, afin d'éviter la prise en compte des particules déviées numériquement pendant la propagation (la largeur w^*_{NP} est mesurée quand le nombre de particules dépasse les 5% de l'échantillon total par position).

La géométrie $3D$ est obtenue par extrusion de la géométrie $2D$ suivant la direction z sur une hauteur $h = 360$ µm. L'analyse des résultats est identique. La mesure de la largeur du flux porteur de nanoparticules est approximée par la même fonction (29) (fig.4.7b). L'approximation des valeurs de r_k est faite avec des coefficients proches des valeurs obtenus en deux dimensions, en particulier le coefficient c. En effet, dans les deux cas, la dépendance en $(r_k)^c$ implique que la position du flux porteur étudié par rapport au maximum du profil de vitesse influe sur le comportement de la largeur de ce flux par rapport au ratio des débits d'injection. Par ailleurs, l'approximation faite sur l'intégrale de la vitesse ne semble pas adaptée à la zone proche des bords (condition de non-glissement).

Cette comparaison implique que les simulations en deux dimensions et en trois dimensions aboutissent au même comportement de la largeur des flux porteurs. Les coefficients ne sont pas entièrement expliqués, notamment les grands écarts avec l'unité des coefficients d'adaptation a et b. Néamoins, ces résultats en deux dimensions sont comparés à des observations expériementales en mesurant la largeur des porteurs de nanoparticules fluorescentes.

3.1.4 Organisation spatiale du flux de nanoparticules



(a) Mesures expérimentales

(b) Résultats expérimentaux en flux

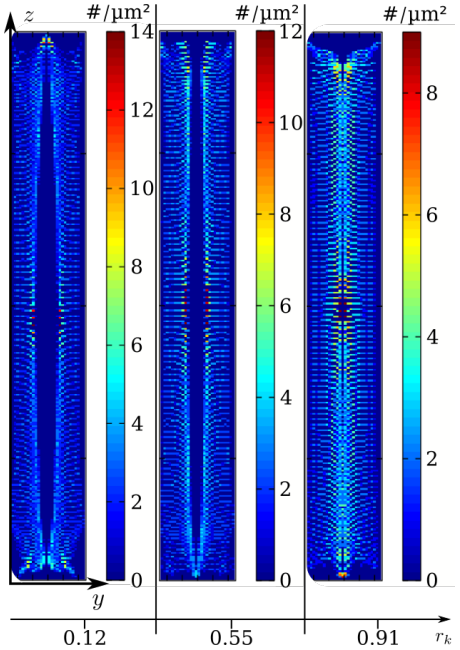
FIGURE 4.8 – **Largeur des flux porteurs.**
Les expériences sont faites en mettant en flux des suspensions de nanoparticules de diamètre inférieur à $\leqslant 100$ nm dans une puce à un niveau de focalisation de canal principal de 50 µm de large et de profondeur de ~ 360 µm. Les flux de particules sont suivie par acquisition de l'émission de fluorescence ou de la dispersion de la lumière blanche (*scattering*). **Fig.a)** Mesures expérimentales sur des nanoparticules en suspension. Les images obtenues sont orientées puis moyennées sur l'axe de l'écoulement. Le profil d'intensité obtenu est ensuite traité pour détecter les pics qui sont enfin caractérisés par leur position et leur largeur à mi-hauteur. **Fig.b)** Superposition des points obtenus en expérience avec le modèle approximant les résultats de la simulation. Malgré la dispersion des points (résolution spatiale et étape de détection des pics) le modèle reproduit la tendance observée expérimentalement avec une suspension de particules nanométriques en écoulement microfluidique. La croube en tiret est l'approximation des points expérimentaux avec la fonction (29) avec les coefficients $a = 3.9$, $b = 6.5$ et $c = 1.05$

La validation de l'approche numérique en deux dimensions se fait expérimentalement en suivant l'émission de nanoparticules (en fluorescence ou en dispersion de la lumière) pour différents rapports de débits r_k (fig. 4.8a). La mise en flux des suspensions est réalisée dans une puce microfluidique verre-Si-verre à un niveau de focalisation. Le canal principal de 50 µm de largeur et 360 µm de profondeur est imagé en lumière blanche ou en fluorescence pendant l'écoulement des solutions. Les débits sont contrôlés directement par le logiciel de l'appareillage microfluidique. Les images renormalisées sont moyennées le long de l'axe de l'écoulement et le profil d'intensité lissé est extrait. Une fonction de détection de pics (maxima locaux) est appliquée au signal. Les occurrences sont alors décrites par leur position, leur largeur à mi-hauteur et leur amplitude. La largeur des pics est ainsi mesurée pour obtenir w^*_{NP} pour chaque valeur de rapport de débits d'entrée.

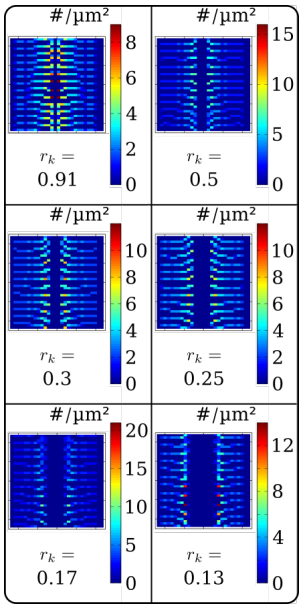
Le tracé de largeur w^*_{NP} en fonction du rapport r_k suit la courbe obtenue en approximant les résultats numériques par le modèle de l'équation 28. La dispersion des résultats est due à la faible résolution spatiale obtenue par le système d'imagerie dans des canaux de cette dimension. Les points expérimentaux suivent le comportement décrit par l'approche numérique en deux dimensions. La géométrie test étudiée numériquement et expérimentalement renvoie donc des résultats cohérents. L'approche développée est donc pertinente pour le dimensionnement des systèmes microfluidiques.

Une description qualitative du comportement des ces suspensions dans une géométrie à trois dimensions plus complète peut se baser sur ce modèle puisque les mesures en $2D$ et $3D$ suivent la même tendance à peu près. L'étude en trois dimensions de l'écoulement avec propagation de particules virtuelles vise à représenter dans une section du canal de sortie la disposition des liquides porteurs de nanoparticules d'or. L'introduction de niveaux supplémentaires de focalisation, notamment dans le plan vertical, nécessite une visualisation de la distribution finale selon l'axe z vertical.

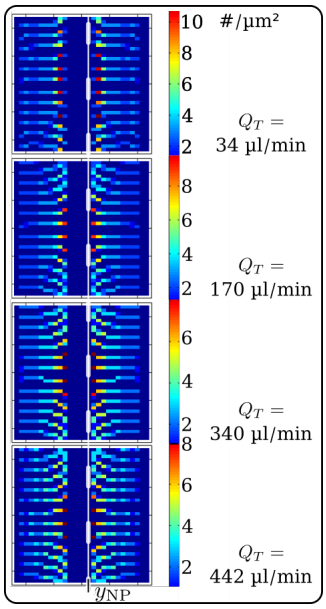
3.2 Contrôle avec deux plans de focalisation hydrodynamique



(a) Densité surfacique de AuNP dans une section droite du canal principal



(b) Section droite du canal pour différents rapports de débit r_k



(c) Section droite du canal pour différents débits totaux Q_T à $r_k = 0.55$

FIGURE 4.9 – **Représentation numérique de la répartition de nanoparticules dans une section du canal de sortie.**
La propagation de particules virtuelles se fait en géométrie 3D pour obtenir la densité surfacique de nanoparticules dans une section droite du canal principal, après l'étape de focalisation symétrique. Le canal est de largeur $w_s = 50$ µm et de profondeur $h = 360$ µm. Le code couleur renvoie le nombre de nanoparticules par µm^2. **Fig.a)** Densité surfacique de nanoparticules dans le plan yz pour trois valeurs de r_k en prenant le flux latéral en flux d'intérêt. Le nombre de nanoparticules par µm^2 reste comparable que cela soit pour $r_k = 0.12$, 0.55 ou 0.91. Le nombre reste également comparable dans les ordres de grandeurs de ce qui est obtenue en photoporation de cellules adhérentes (~ 8 part./cell. dans le Chapitre 2). **Fig.b)** Agrandissement de la partie centrale ($y \in [-w_s/2; w_s/2], z \in [-h/2; h/2]$) de la section droite du canal principal pour différentes valeurs de r_k. Qualitativement, la zone où la densité de nanoparticules est nulle s'élargit en diminuant r_k pour le flux latéral. La présence d'un "mur" de nanoparticules multiplie les sites de génération de nano-bulles de vapeur. La densité obtenue ici dépend par ailleurs de la concentration initiale de la suspension de nanoparticules. **Fig.c)** Agrandissement de la partie centrale ($y \in [-w_s/2; w_s/2], z \in [-w_s/2; w_s/2]$) de la section droite du canal principal pour différentes valeurs de débit total Q_T pour $r_k = 0.55$. La droite en pointillés blanche marque la position y_{NP} telle que $w_{NP} = w_s/2 - y_{NP}$. Cette position ne change pas quelle que soit la gamme de débit total injecté dans la géométrie de focalisation, comme ce qui a été observé lors des simulations en deux dimensions (fig.4.5).

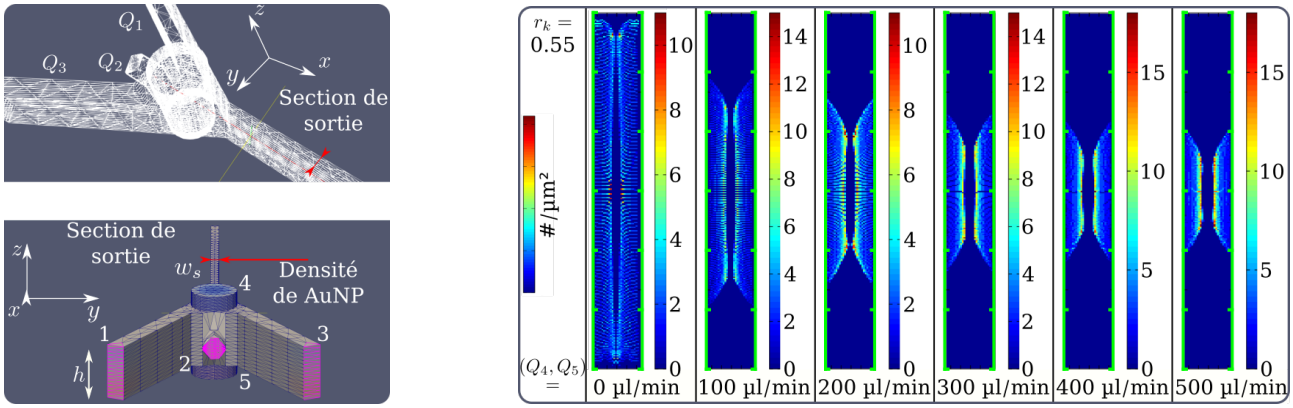
Soit la géométrie test étudiée dans la sous-section précédente. Son implémentation en trois dimensions est réalisée par extrusion de la géométrie $2D$. Les canaux ont une profondeur de $h = 360$ µm et une largeur de $w_s = 50$ µm. La propagation de particules virtuelles pour l'établissement de leurs trajectoires et de leurs distribution à la section de sortie dans le plan yz est complétée par une cartographie dans la section droite du canal principal. Cette section est caractérisée par une densité surfacique de nanoparticules.

La section de hauteur h et de largeur w_s est découpée en surface de 1 µm^2. Le nombre de nanoparticules par zone est relevé pour chaque valeur du paramètre r_k (fig.4.9a). La zone d'intérêt de cette section est la surface centrée sur la cellules dont la position correspond au centre du canal. La même représentation est effectuée sur une zone restreinte de 50×50 µm^2 pour la zone d'intérêt (fig.4.9b). La densité estimée au voisinage du centre du canal ne varie pas avec le paramètre r_k. Cependant, l'élargissement de la zone à densité de nanoparticules est comparable le comportement établi en deux dimensions. En fixant ce dernier pour différents débits totaux

Q_T, la position y_{NP} reste fixe et la densité de nanoparticules n'est pas influencée (fig.4.9c).

La distribution de nanoparticules est utile autour des cellules. Dans l'hypothèse qu'elles soient centrées dans le canal, l'introduction de flux de focalisation verticale permet de restreindre l'épaisseur de nanoparticules autour des cellules et de varier la distance. Si l'irradiation se fait suivant les z croissants, la focalisation verticale optimise la génération de nano-bulles autour des cellules.

3.2.1 Focalisation 3D et concentration des nanoparticules



(a) Géométrie avec une focalisation à trois dimensions

(b) Variation des débits verticaux pour $r_k = 0.55$

FIGURE 4.10 – **Représentation numérique de la répartition de nanoparticules dans une section du canal de sortie avec la focalisation 3D.**
L'intérêt d'une telle approche est de moduler la concentration de nanoparticules au voisinage des cellules. La géométrie exploitée dans la fig.4.9 est modifiée en y ajoutant des entrées verticales – toute chose égale par ailleurs – symétriques par rapport au plan xy pour réaliser une focalisation en trois dimensions. **Fig.a)** Implémentation d'un niveau de focalisation verticale dans la géométrie de focalisation initiale. Le maillage des nouvelles entrées est effectué en extrudant le maillage en deux dimensions évidé par un disque en son centre. Après extrusion, un maillage cylindrique est additionné pour relier les entrées verticales au bâti de la puce microfluidique. Les entrées dans le plan xy sont alimentées par les débits Q_1, Q_2 et Q_3. Le canal principal de largeur w_s est ensuite visualisé dans une section droite de sortie. Les entrées verticales sont alimentées par les débits Q_4 et Q_5 égaux. **Fig.b)** Modification de l'épaisseur de la distribution de nanoparticules d'or dans le canal microfluidique par variation des débits verticaux Q_4 et Q_5 pour $r_k = 0.55$ et $Q_1 + Q_2 + Q_3 = 170$ µl/min dans le plan xy. La section du canal principal $y \in [-w_s/2; w_s/2], z \in [-h/2; h/2]$ est représentée. Introduire un débit de 500 µl/min, soit un r_k vertical de ~ 0.75 réduit l'épaisseur de la distribution de h à $4/6h$. Puisqu'il s'agit d'une focalisation dans un plan orthogonal et que l'on peut négliger la pesanteur, le comportement doit suivre le modèle établi précédemment pour la largeur du flux focalisé.

La géométrie en deux dimensions (fig.4.5a) est extrudée sur une hauteur h. L'implémentation des entrées verticales pour effectuer la focalisation verticale est faite en introduisant un cylindre traversant la géométrie extrudée (fig.4.10a). Les débits dans le plan yz sont notés Q_4 et Q_5 et sont pris symétriques.

Pour une valeur $r_k = 0.55$ pour les débits dans le plan xy, l'augmentation des débits (Q_4, Q_5) permet la focalisation dans le plan yz. Les effets de la pesanteur étant négligeables, par conséquent, le comportement doit être similaire à celui obtenu dans le plan xy (fig.4.10b). Introduire un débit de 500 µl/min, soit un r_k vertical de ~ 0.75 réduit l'épaisseur de la distribution de h à $4/6h$.

La réduction de l'épaisseur à concentration de nanoparticules fixée permet localement d'augmenter la densité surfacique au voisinage des cellules (fig.4.10b) Qualitativement, l'introduction d'un débit verticale de 500 µl/min par

les deux entées 4 et 5 donne une densité maximale de 15 part./μm^2 contre 10 à débits verticaux nuls.

La multiplication des niveaux de focalisation est donc un moyen de moduler le nombre de nanoparticules au voisinages des cellules au vue de la photoporation en flux. L'introduction d'un niveau supplémentaire de focalisation dans le plan xy a pour but de moduler l'épaisseur du flux porteur de nanoparticules – et donc leur concentration – ainsi que la distance les séparant des cellules.

Il apparaît que l'introduction d'un deuxième niveau de focalisation abouti au même écoulement des suspensions (ici de la Rhodamine 110). La modulation de la largeur et de la position des flux porteur de nanoparticules (par les entrées 4 et 5) est alors possibles en variant les débits $Q_{1,2,3}$ des entrées centrale et externes. Mais cette variation permet également d'influencer la densité de nanoparticules par unité de volume.

3.2.2 Modulation de la concentration de nanoparticules par unité de volume

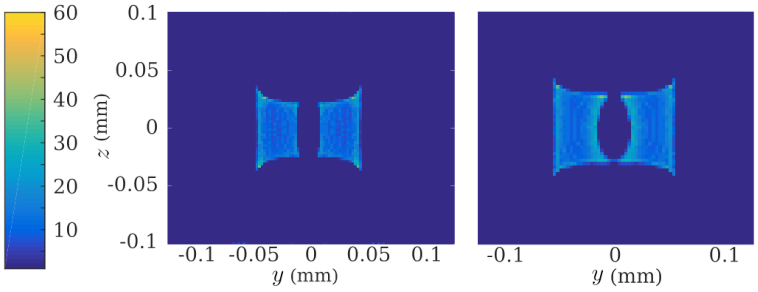
La géométrie du canal central influe sur l'organisation des flux latéraux internes porteurs de nanoparticules dans la section droite du canal (fig 4.11a). Une entrée de section rectangulaire crée une organisation de type "tranchée" (figure de gauche) avec deux fronts de nanoparticules verticaux. Les cellules sont donc exposées à deux potentielles nano-bulles de vapeurs uniquement sur les cotés. Pour une section circulaire, l'entrée permet d'organiser l'écoulement sous forme de gaine entourant complètement le flux central porteur de cellules, reproduisant ainsi une couverture à 2π autour du canal central.

L'irradiation se fait suivant l'axe des z. Une répartition des sites de génération de nano-bulles sur 2π autour des cellules ou sur 2α, avec α l'angle solide formé entre le centre du canal et le l'épaisseur de nanoparticules à y_{NP}, conduit au même nombre par cellules selon la densité surfacique. En revanche, sur le plan de la microfabrication, il est plus simple d'effectuer des gravures de même rapport d'aspect et de formes géométriques.

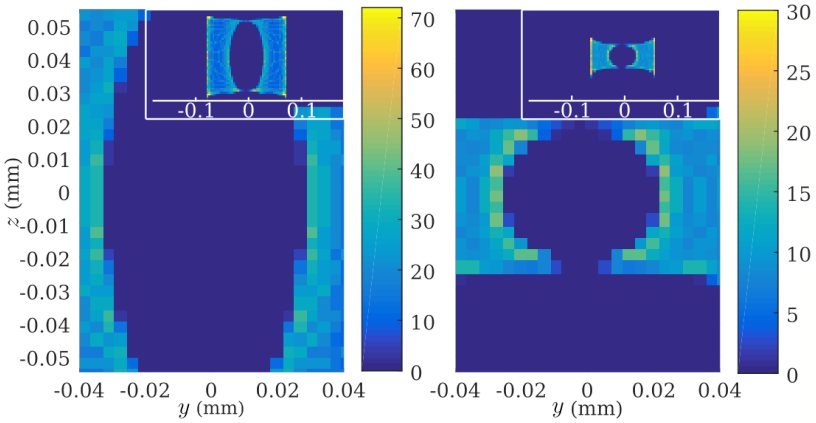
Soit r_2 le rapport entre le débit du canal central Q_2 et la somme des débits restants, soit $Q_T - Q_2$. La diminution de ce rapport de 0.1 à 0.025 conduit la densité surfacique de nanoparticules de croître d'un maximum de $\sim$ 30 part./μm^2 pour $r_2 = 0.1$ à $\sim$ 70 part./μm^2 pour $r_2 = 0.025$ (fig.4.11b). L'intérêt de cette approche permet la modulation des contraintes générées et subies par les cellules en fonction de leur sensibilité ou de la quantité d'agent exogènes à intégrer dans le cytoplasme.

Cependant, la multiplication des niveaux de focalisation impose à la fois l'adaptation de l'appareillage microfluidique mais introduit également des sources d'instabilités supplémentaires, par exemple, l'asservissement des entrées de la pression en fonction des débits. Par conséquent, la modification de la profondeur génère un même effet que le niveau de focalisation introduit dans le plan yz, à ceci prêt que ce réglage est donc propre à chaque puce microfluidique et donc définitif (fig.4.11a). Il n'y a pas de changement majeur entre les trois valeurs de profondeurs h en terme de largeur de flux. De façon similaire à la concentration obtenue dans la puce avec $w_s = 50$ µm et la focalisation en $3D$, la diminution de la profondeur varie sensiblement la densité surfacique de nanoparticules de 20 à 40 part./μm^2 au voisinage du canal central.

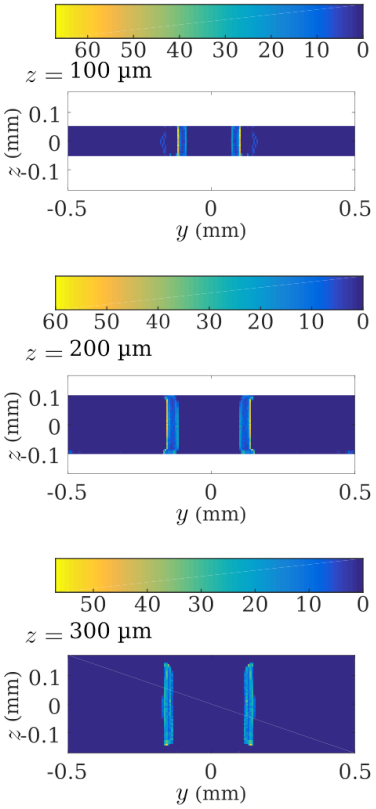
L'intérêt d'une géométrie à deux niveaux de focalisation dans le même plan xy réside en la possibilité de moduler la largeur des flux de nanoparticules – et donc leur concentration – ou de cellules en même temps que la distance les séparant. Une autre intérêt réside en l'introduction d'un liquide séparateur en lieu et place de la suspension de cellules. En l'occurrence, l'injection des suspensions d'intérêt est réalisée par les entrées 4 et et 5



(a) Forme de l'entrée centrale et distribution de nanoparticules



(b) Variation de la densité pour $r_2 = 0.1$ à gauche et $r_2 = 0.025$ à droite



(c) Variation de la profondeur du canal

FIGURE 4.11 – **Représentation numérique de la répartition de nanoparticules dans une section du canal de sortie.**
Fig.a) Influence de la forme de l'entrée (rectangulaire à gauche et circulaire à droite) sur l'organisation des nanoparticules dans une section droite du canal principale d'une puce microfluidique. La forme géométrique de l'entrée centrale permet d'affiner la distribution des particules autour du canal central dans le plan yz pour passer d'une forme de tranchée à une gaine sur 2π autour du centre. L'approche est intéressante pour l'optimisation de la répartition des sites de génération de nano-bulles de vapeur. **Fig.b)** Variation de la densité surfacique de particules dans une section du canal avec une focalisation 3D avec deux niveaux. L'augmentation des débits des flux de focalisation dans les deux plans xy et yz ($r_2 = 0.1$ à gauche et $r_2 = 0.025$ à droite) accroît d'un facteur $\geqslant 2$ le nombre de particules par unité de surface. Ici, le rapport r_2 est pris par rapport à tous les débit, soir $r_2 = Q_2/(Q_{\text{lat. int}} + Q_{\text{lat. ext}} + Q_{\text{vert}}$ où $Q_{\text{lat. int}}$ sont les entrées 4 et 5, $Q_{\text{lat. ext}}$ les entrées 1 et 3 et Q_{vert} les entrées verticales. **Fig.c)** Réduction de l'épaisseur de la distribution de nanoparticules suivant l'axe verticale z en modifiant la profondeur de la puce microfluidique. Numériquement, la variation de la profondeur de la section du canal de sortie, à concentration de nanoparticules dans la suspension fixée, permet de "focaliser" l'écoulement dans le plan yz. Cette approche permet de s'affranchir d'appareillage fluidique supplémentaire et de sources d'instabilités pendant une éventuelle photoporation en flux. En revanche, l'augmentation de la densité est lente mais est compensée dans le plan xy.

pendant que l'entrée 2 injecte un liquide tampon séparateur. La modulation du débit de ce dernier permet le contrôle de la distance.

3.3 Contrôle de la distance cellules-nanoparticules avec un flux séparateur

Pour des paramètres plasmoniques données garantissant la génération de nano-bulles de vapeur, la modulation des contraintes mécaniques sur les membranes cellulaires se fait en variant la distance entre les sites d'émissions des ondes de chocs, de pression et des forces de cisaillement et la membrane. L'utilisation de la focalisation hydrodynamique à plusieurs niveaux permet de contrôler la distance entre deux suspensions de nanoparticules et les cellules dans le canal central. Les cellules sont ainsi entourées de sources de contraintes mécaniques. Cependant, pour un faisceau laser elliptique comme celui introduit dans les Chapitres 2 et 3, le maximum d'intensité coïncide avec le centre du canal dans le cas de la configuration "tranchée" ou gaine de nanoparticules. L'introduction d'un liquide séparateur en se limitant à un flux porteur de nanoparticules plasmoniques permet d'optimiser l'apport d'énergie optique dans la génération de nano-bulles de vapeur.

3.3.1 Géométrie à plan de focalisation unique

Le contrôle de la distance entre cellules et nanoparticules est établi en introduisant un liquide séparateur dont le débit est couplé au flux de focalisations externes. En fixant le débit total Q_T, la variation du débit Q_2 du séparateur est compensée par le débit latéral externe adjacent au flux porteur de cellules de débit Q_3 (fig.4.12b). La mesure de la distance se fait en relevant la position des maximas des profils d'intensité pour différentes valeurs de r_2.

Pour $Q_{4,5} = 5$ µl/min et $Q_{4,5} = 10$ µl/min, le flux porteur de nanoparticules reste stable autour de $y_0 = 0$ (fig.4.12c). Parallèlement, l'augmentation du rapport r_2, permet d'accroître la distance entre les deux flux porteurs 4 et 5, notée $d_{\text{Cell-AuNP}}$ (fig.4.12d). L'intérêt de cette approche est la stabilisation des nanoparticules par rapport au laser d'excitation dont la position est fixe dans la puce microfluidique. Le décalage à débit constant fixé garantit également la largeur des flux porteurs et donc d'une part sur l'organisation des cellules suivant l'axe de l'écoulement, et d'autre part sur le nombre de nanoparticules par unité de temps et de volume.

Le comportement linéaire permet d'interpoler les valeurs du débit du flux séparateur pour augmenter la résolution (fig.4.12d). Ramenée à une valeur de débit Q_2, la tendance donne que chaque incrément de 1 µl/min, pour un débit $Q_{4,5} = 5$ µl/min, augmente $d_{\text{Cell-AuNP}}$ d'environ 6.5 µm. Le choix de $Q_{4,5} = 5$ µl/min permet l'obtention d'une largeur de flux porteur de cellules comparable au diamètre type de cellules HeLa ($\sim 30-50$ µl/min).

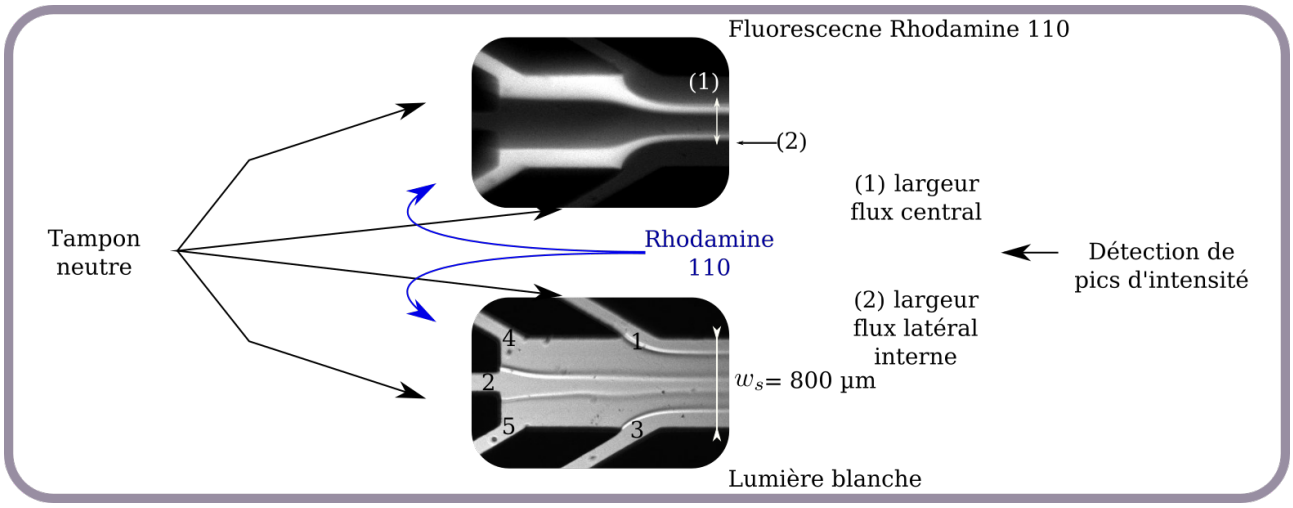
Le contrôle de la distance $d_{\text{Cell-AuNP}}$ permet donc la modulation des contraintes mécaniques subies par les cellules à l'émission par les nano-bulles de vapeur. Une autre source de contraintes dans un écoulement microfluidique reste le cisaillement dû à la variation spatiale du profil de vitesse dans les directions perpendiculaires à l'écoulement (dans le canal principal, suivant y et z par exemple).

3.3.2 Taux de cisaillement pour les cellules

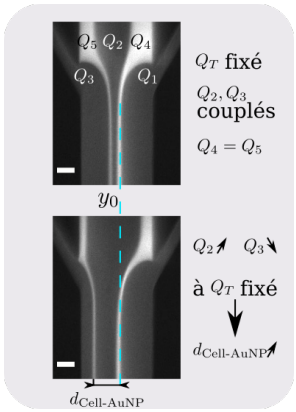
La mesure du taux de cisaillement au sein de l'écoulement microfluidique exposé ici se fait suivant la formule :

$$\tau_x = \mu \frac{\partial u_x}{\partial y} \quad \tau_y = \mu \frac{\partial u_y}{\partial x} \tag{30}$$

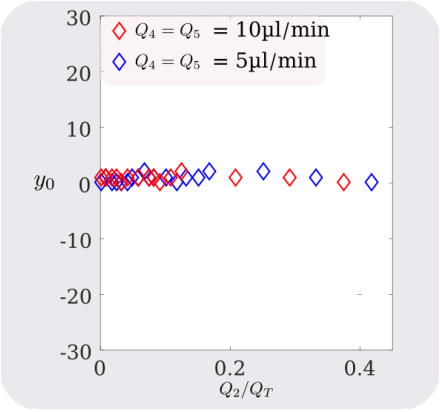
où u est le vecteur vitesse et μ la viscosité du liquide. Cette grandeur est calculée après résolution de l'équation de l'écoulement en tout point de la puce microfluidique à débit total fixé ($Q_T = 120$ µl/min) pour différentes configurations de débits d'entrée entraînant différentes valeurs de $d_{\text{Cell-AuNP}}$ (fig.4.13a et b).



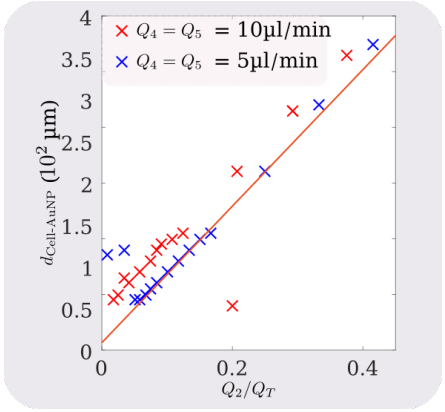
(a) Puce microfluidique avec $w_s = 800$ µm et deux niveaux de focalisation 2D



(b) Contrôle de la distance à débit total fixé



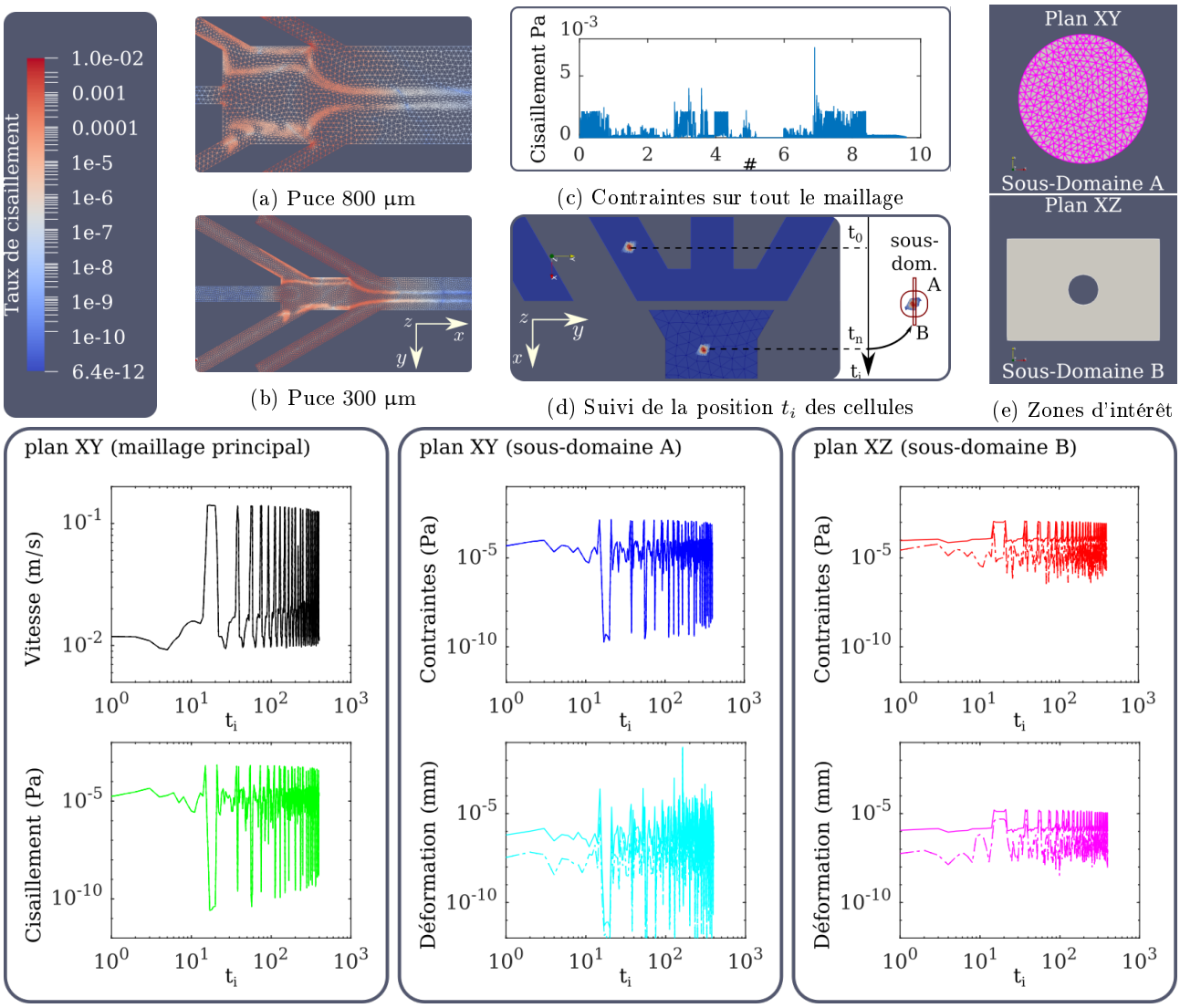
(c) Position de référence y_0 (nanoparticules)



(d) Variation de la distance entre cellules et nanoparticules

FIGURE 4.12 – **Contrôle de la distance cellule-nanoparticules avec un séparateur.**
Le débit total est maintenu constant égal à $Q_T = 120$ µl/min dans une puce microfluidique avec deux niveaux de focalisation 2D avec $w_s = 800$ µm. **Fig.a)** Images en lumière blanche (gauche) et en fluorescence (droite) d'une puce microfluidique avec deux niveaux de focalisation $2D$. Le canal principal fait une largeur $w_s = 800$ µm et la puce a une profondeur $h = 100$ µm. Les entrées latérales externes 1 et 3 focalisent le flux issu du premier niveau amené par les entrées 4,2 et 5. La caractérisation expérimentale de cette géométrie se fait en suivant l'intensité d'une solution de Rhodamine 110 injectée par les entrées 4 et 5 (latérales internes). Les largeurs du flux central et des flux porteurs de la solution de Rhodamine 110 sont mesurées pour les rapports de débits r_k correspondant (donc r_2 et $r_{4,5}$). **Fig.b)** Une solution de Rhodamine 110 est injectée par les entrées 4 et 5 aux débits Q_4 et Q_5 égaux respectivement. Le liquide séparateur est injecté par l'entrée centrale avec un débit Q_2. La variation de Q_2 est couplée avec le débit Q_3 de l'entrée latérale externe adjacente au porteur de cellules (ici Q_5). Quand Q_2 augmente, Q_5 diminue pour déplacer le flux de cellules par rapport au flux de nanoparticules qui reste fixe. **Fig.c)** Suivi de la position de nanoparticules pour différentes valeurs de r_2 (ordonnées en pixels). Les nanoparticules restent fixes ce qui permet de positionner le laser de façon à les irradier par le maximum d'intensité. **Fig.d)** Évolution linéaire de la distance entre les cellules et les nanoparticules $d_{\text{Cell-AuNP}}$ (courbe de tendance) en fonction du rapport r_2 pour les deux valeurs de débits $Q_{4,5} = 5, 10$ µl/min. Le décalage s'explique par la mesure de la largeur à mi-hauteur. Les flux étant plus larges pour 10 µl/min, la position des pics d'intensité est décalée par rapport à 5 µl/min.

Les valeurs obtenues, particulièrement dans les zones d'écoulement où les cellules sont susceptibles de passer (maillages raffinés) restent faible ($\sim 10^{-3}$ Pa) et ce pour les deux largeurs de canaux $w_s = 300$ et $w_s = 800$ µm (fig.4.13c). Cependant, ces contraintes sont établies dans une géométrie à deux dimensions, qui ne prend pas



(a) Puce 800 µm

(b) Puce 300 µm

(c) Contraintes sur tout le maillage

(d) Suivi de la position t_i des cellules

(e) Zones d'intérêt

(f) Contraintes mécaniques en écoulement

FIGURE 4.13 – **Calcul numérique du taux de cisaillement et contraintes fluidiques dans des puces avec $h = 100$ µm et $w_s = 300 - 800$ µm.**
L'équation de l'écoulement instationnaire est résolue pour différentes itérations. Le débit total est maintenu constant (120 µl/min). Les débits d'entrées (Q_2 et Q_3) sont variés au fil des itérations pour modifier la distance $d_{\text{Cell-AuNP}}$. **Fig.a,b)** Cartographie du cisaillement dans des puces microfluidiques avec $w_s = 300$ µm et $w_s = 800$ µm selon l'équation (30). Le taux de cisaillement reste inférieur à ~ 2 Pa. **Fig.c)** Valeur du cisaillement en tout point du maillage de la fig.b dans le plan horizontal de l'écoulement . **Fig.d)** Suivi de la trajectoire des cellules pas à pas. Une espèce "discrète" est convectée par le champ de vitesse. La position du maximum de concentration t_i à chaque pas de temps est gardée en mémoire pour le calcul des contraintes locales. **Fig.e)** Sous-domaines maillés dans les plans vertical xz et horizontal xy pour chaque position t_i de la fig.d. Ces domaines représentent la surface occupée par une cellule en écoulement. **Fig.f)** Grandeurs mesurées dans différents maillages en fonction des positions des cellules.

en compte la profondeur du canal, bien inférieure à sa largeur et donc susceptible de contribuer au cisaillement suivant l'axe z.

Après résolution de l'équation de l'écoulement en stationnaire dans le plan xy, l'équation de Stokes instationnaire est résolue temporellement et des phases sont injectées par les entrées latérales internes (4 et 5). Une première phase continue (suspension de nanoparticules) est injectée par l'entrée 4 (entrée du haut fig.4.13a

et b) pour induire une adaptation de maillage au fur et à mesure de sa convection par le champ de vitesse. Par ailleurs, une phase discrète – introduite à chaque dixième itération – est injectée par l'entrée 5 (bas) pour marquer la trajectoire des cellules. Cette phase est suivie et les valeurs de cisaillement sont relevées à chaque position.

Parallèlement, le champ de vitesse est résolu dans un domaine rectangulaire orienté dans le plan xz en prenant comme condition au bord les vitesses à la position de la cellule à chaque itération (fig.4.13d). Le cisaillement dans ce plan est calculé alors à chaque itération. Les deux calculs aboutissent donc à la cartographie du cisaillement dans deux plans de la cellule en écoulement.

la déformation de la cellule est déduite suivant le problème d'élasticité de Lamé :

$$-\mu_c \Delta \boldsymbol{\epsilon} - (\mu_c + \lambda)\nabla(\nabla \cdot \boldsymbol{\epsilon}) = \boldsymbol{f}$$

où $\boldsymbol{\epsilon}$ est le vecteur déformation. Le terme source $\boldsymbol{f}$ comprend les contraintes fluidiques de cisaillement. λ et μ_c sont les coefficients de Lamé dépendant des modules d'Young et de Poisson du système étudié, ici une cellule HeLa. Ce problème est résolu dans les deux sous domaines A et B des plans xy et xz respectivement (fig.4.13d et e).

Chaque position $t_i = (x_i, y_i)$ occupée par la cellule pour différentes valeurs de débits d'entrée est donc caractérisée par le champ de contraintes de cisaillemement dans deux directions. Les deux sous domaines se trouvent dans les plans où la variation de vitesse est la plus importante. Donc les déformations induites par ces composantes du cisaillement sont les bornes supérieures de la position de la cellule à chaque itération.

Le champ de déformation est donc obtenu à partir des valeurs de cisaillement elles mêmes déduite des champs de vitesse (fig.4.13f). Pour différentes configurations de débits et positions dans l'écoulement, les cellules sont soumises des déformations de l'ordre 0.001 µm avec un maximul de 1 µm calculé dans le sous domaine A (plan xy). Pour des cellules mammifères, les déformations critiques induitent par cisaillement on des valeurs de $3-40\%$ selon la lignée [223, 224]. Avec une puce de canal principal de largeur 300 µm, la déformation relative calculée (renormalisée à la taille de la cellule $\sim$ 30 µm) par le problème d'élasticité est de l'ordre de 0.003% avec un maximum de 3% appliqué pendant une durée $\leqslant$ 1 ms. La contribution de la géométrie microfluidique utlisée ici reste négligeable devant les seuils pouvant réduire la viabilité de cellules en écoulement.

L'approche introduisant un écoulement séparateur *via* le canal central permet d'irradier les nanoparticules avec une intensité maximum du faisceau laser. Le contrôle de la distance se fait par incrément de débits tout en maintenant le flux porteur de nanoparticules à une position fixe. Par ailleurs, le décalage des cellules suivant l'axe y préserve leur arrangement et la concentration des nanoparticules. Enfin, les contraintes générées par l'écoulement microfluidique restent faibles devant les seuils critiques pour la viabilité des cellules.

4 Conclusions et Ouverture : contrôle directe de la distance

Deux approches numériques sont mises en places pour suivre et déterminer l'organisation de nanoparticules en écoulement dans un canal microfluidique avec une géométrie de focalisation. L'approche avec les différences finies vise à décrire la distribution de nanoparticules en suspensions injectées par une entrée latérale dans le but de créer une gaine de nanoparticules qui vient entourer le centre du canal principal. Cette configuration permet de générer des nano-bulles de vapeur autour des cellules à l'irradiation des intermédiaires plasmoniques par le laser de photoporation. L'implémentation dans un logiciel de modélisation aux éléments finis permet d'établir les paramètres géométriques et fluidiques les plus pertinents pour le contrôle de cette organisation.

Le comportement obtenu numériquement dans une géométrie test à un niveau de focalisation est confronté aux résultats expérimentaux pour validation. Les deux jeux de données suivant la même tendance, l'approche numérique est alors exploitée pour introduire de nouveaux éléments de focalisation pouvant optimiser la distribution et concentration de nanoparticules pour un protocole de photoporation en flux, à savoir, deux niveaux de focalisation dans le même plan et un troisième dans le plan orthogonal.

L'étude qualitative de ces améliorations pousse à envisager la double focalisation dans le même plan comme meilleure stratégie pour la photoporation en flux. D'une part, la multiplication des entrées dans une configuration où les cellules sont injectées en central et les nanoparticules par les entrées latérales internes permet de moduler la densité de nanoparticules par unité de volume. Par ailleurs, les flux porteurs externes qui servent à focaliser le premier niveau de focalisation servent à compenser les variations de débit, limité par la cadence de répétition de 10 Hz du laser de photoporation. En effet, l'élargissement du séparateur est couplé inversement au débit du flux externe adjacent au flux porteur de cellules, pour se maintenir à débit total fixé.

D'autre part, une modification de l'injection des suspensions permet une optimisation de l'irradiation au profil spatial du faisceau laser. En effet, avec une irradiation faite par un faisceau elliptique, comme présentée dans les Chapitres 2 et 3, la gaine de nanoparticules ne coïncide pas avec le maximum d'intensité. L'injection d'une gaine de nanoparticules entourant les cellules implique que le maximum d'énergie optique irradie les cellules et non les intermédiaires plasmoniques. Dans le cas de l'injection d'un séparateur entre les flux porteurs des deux suspensions, l'énergie de l'irradiation de la phase plasmonique est alors contrôlable. La distance entre cellules et sites de génération de nano-bulles est ainsi simplement modulable à travers les débits des flux latéraux.

Les deux niveaux de focalisation permettent donc des degrés de libertés supplémentaires en vue de la photoporation en flux. La distance, et donc la modulation des effets mécaniques sur les membranes des cellules, est réalisable directement en maintenant la largeur des flux porteurs constante. Indirectement, la concentration et l'arrangement des suspensions à débit total fixé restent donc inchangés. Par ailleurs, le déplacement du flux porteur de nanoparticules, par rapport au profil du laser, permet de varier l'énergie effective d'excitation des plasmons. Enfin, Les deux flux porteurs restent séparés tout au long du processus ce qui permet l'extraction des nanoparticules et des cellules par deux sorties distinctes.

La deuxième approche numérique consistant à implémenter des phases soumises à la convection renvoie les différentes sollicitations fluidiques que subissent les cellules en écoulement pour différentes configurations de débits d'entrée et donc de distance de séparation. En déterminant les vitesses d'écoulement dans les deux plans de la géométrie microfluidique à trois dimensions, un problème d'élasticité appliqué à la cellule est résolu et les déformations du système sont ainsi déduites. Quelle que soit la position dans la puce étudiée, les contraintes

de cisaillement et la déformation qui en découle reste faible devant les seuils critiques pouvant limiter la viabilité.

Ce chapitre numérique a établi deux approches exploitables pour la photoporation en flux dans une puce microfluidique. Si l'injection d'une "gaine" de nanoparticules optimise le placement de ces dernières autour de la cellule pour la création de nanopores, elle réduit l'exploitation de l'irradiation en termes d'excitation de plasmon. Par ailleurs, l'approche introduisant un liquide séparateur permet un contrôle plus large des paramètres de photoporation comme la concentration, la distance de séparation pendant l'irradiation et la possibilité de séparation après l'irradiation.

CHAPITRE 5

PHOTOPORATION EN FLUX : SÉPARATION DES CELLULES ET DES NANOPARTICULES EN MICROFLUIDIQUE

Préambule :

Le Chapitre 2 a présenté les études de photoporation par intermédiaire plasmonique de cellules adhérentes par la génération de nano-bulles de vapeur (VNB). Le dispositif optique développé a été caractérisé et la perméabilisation décrite par la fraction de cellules positives, la viabilité et l'efficacité d'incorporation (évaluation de la fluorescence intracellulaire).

Les protocoles mis en place dans cette étude ont été adaptés dans le Chapitre 3 à des expériences effectuées sur un dispositif opto-fluidique pour réaliser la photoporation en flux d'une suspension de cellules contenant des nanoparticules d'or en suspension. La caractérisation des performances de photoporation confirme la génération de nano-bulles et valide le dispositif pour la séparation entre les phases biologiques et plasmoniques.

Le Chapitre 4 établit les configurations fluidiques pour effectuer la photoporation en flux à distance. Les cellules et les nanoparticules sont injectées séparément dans la puce microfluidique où se produit l'irradiation. L'intérêt de cette approche est d'extraire un échantillon traité sans nanoparticules. Pendant l'irradiation, la modification de la distance séparant les sites de génération de VNB et les cellules module les contraintes mécaniques et rend l'approche compatible avec différentes lignées cellulaires selon leur seuil d'endommagement mécanique.

Trois configurations sont présentées pour la réalisation de la photoporation à distance en écoulement microfluidique. Les trois approches sont caractérisées par les grandeurs usuelles (fraction positive et viabilité) afin d'isoler la méthode optimale pour le traitement de cellules à haut-débit. L'approche avec séparateur présente des aspects positifs en terme de viabilité et de contrôle de la perméabilisation.

1 Photoporation en flux à distance

La photoporation en flux présentée dans le chapitre 3 permet de s'affranchir de l'étape de pré-incubation. Dans le cas de la photoporation de cellules adhérentes, cette étape requiert une différence de charge entre intermédiaires plasmoniques et cellules pour créer des interactions électrostatiques responsables de l'adsorption. En mélangeant les deux phases sans favoriser l'adsorption et ainsi sans contraintes sur leurs charges respectives, la photoporation en flux est réalisée en irradiant la suspension dans les conditions de générations de nano-bulles de vapeur.

L'adsorption n'est pas favorisée mais l'approche nécessite une étape en sortie de puce pour séparer les cellules photoporées et les nanoparticules. Les méthodes développées lors du chapitre 4 maintiennent les deux solutions séparées tout au long du processus de photoporation. Cette photoporation à distance limite le contact entre cellules et des matériaux potentiellement cytotoxiques. Elle introduit par là-même un autre paramètre qui intervient dans la perméabilisation de la membrane et qui par conséquent influe sur la performance de perméabilisation.

Distance cellule-nanoparticules et toxicité

L'or, à l'échelle macroscopique, est considéré comme un élément biologiquement inerte. Pour des structures nanométriques en revanche, la cytotoxicité de ce matériau dépend de plusieurs paramètres [89, 90]. L'or peut ainsi avoir différents impacts sur le métabolisme et le destin cellulaire selon les modifications apportées, à savoir la taille, la géométrie, la concentration de la solution ou encore la fonctionnalisation de la surface. L'ingestion (endocytose) de ces nano-structures entraîne une cytotoxicité qui peut se manifester par l'endommagement de l'ADN ou l'induction d'un stress oxydant avec une l'altération de protéines (mauvais repliement) [97, 225].

La taille des nano-structures utilisées en bio-médecine varie de quelques nanomètres au micromètre. Son influence sur la cytotoxicité est abondamment étudiée et les conclusions sont variées. D'une part, les tailles entre 5 et 50 nm causent peu de dommages aux cellules mais des valeurs plus petites — comme des nanoparticules d'or synthétisées ou leur débris après irradiation — ont pour conséquence une réduction du métabolisme [93]. En effet, des éléments de quelques nanomètres sont comparables aux molécules impliquées dans l'endocytose cellulaire et sont facilement absorbés [93, 94].

D'autre part, pour une solution de nanoparticules données, la dispersion de la suspension, qui décrit le degré d'agrégation, varie selon la concentration d'électrolytes dans le milieu, comme par exemple les sels de Na. La présence de protéine peut également créer des interactions électrostatiques inter-nanoparticules, par exemple *via* la création d'une couronne de protéine type Trypsine, qui peut favoriser la formation d'agrégats. L'endocytose est possible pour des agrégats jusque 100–1000 nm et peut entraîner une cytotoxicité accrue pour des valeurs de tailles de particules plus grandes. Ces manifestations restent, entre autre, la génération d'espèces réactives d'oxygène suivie d'apoptose [92, 96].

La disparité des résultats rend compte de la complexité de cette évaluation qui implique le type cellulaire, la nature des éélments ciblés par les nanoparticules ou les modifications de celles-ci. Par exemple, la modélisation de la traversée de la paroi lipidique de la membrane par les nanoparticules montre l'importance de la charge en surface [91, 226]. Par conséquent, les cellules exposées n'ont pas la même réponse selon si les nanoparticules sont cationiques ou anioniques. Les charges et plus largement l'état de surface obtenus avec les différentes fonctionnalisations aboutissent à différents degrés de toxicité [70]. De même, le rapport d'aspect des nanoparticules

accroît la cytotoxicité plus la forme s'éloigne d'une sphère [92].

Les études de toxicité sont très couramment appliquées à des cultures mono-couche en deux dimensions. Cependant, les modèles en trois dimensions sont plus réalistes étant une projection plus proches des réalités *in vivo*. Cette transition de deux à trois dimensions indique des différences de résultats dans les études de nanotoxicité notamment du fait de la surface de contact [101, 102]. Malgré les divergences, il est cependant établi que les nanoparticules d'or ne sont pas biodégradables [103]. D'autant plus qu'en terme de cytotoxicité, leur altération (fusion, fragmentation) par photo-modification peut générer des débris et créer ainsi une large distribution de tailles de nano-structures potentiellement cytotoxiques [150].

Enfin, la versatilité de l'approche exposée au chapitre 3 permet l'usage de n'importe quel type d'intermédiaire plasmonique. Les nanoparticules à base d'argent ou de cadmium sont plus toxiques pour les cellules que leur équivalent en or qui reste l'alternative la plus viable [92, 97]. Si les performances plasmoniques sont amplifiées mais la toxicité est avérée, la séparation des cellules et des nanoparticules devient alors une démarche nécessaire pour la photoporation.

Distance cellule-nanoparticules et modulation la perméabilisation

Quel que soit le moyen de génération, par intermédiaire plasmonique ou par excitation optique directe, les nano-bulles de vapeur génèrent des nanopores dans la membrane cellulaire [56]. La dynamique des bulles en cavitation est un phénomène complexe s'étalant sur plusieurs échelles (en particulier s'il est créé optiquement) et générant plusieurs événements pouvant induire un stress mécanique [66].

Une première onde de choc acoustique est générée avant même la création de la nano-bulle de vapeur 0.1-10 ns après excitation du milieu ou de la nanoparticule plasmonique [76, 77]. Malgré une pression d'amplitude considérable ($\approx$ 100 MPa), les membranes au voisinage du site du nucléation (optoporation sans intermédiaire) ne sont pas significativement altérées [77].

Une bulle en cavitation alterne des cycles d'expansion et de contraction. Lors de la première phase, des ondes acoustiques importantes sont émises mais l'effet des forces de cisaillement générées par le déplacement du liquide environnant sont la première cause de déformation des cellules et de l'altération locale de leurs membranes [77]. Quand une bulle se dilate pour atteindre son rayon maximal, influencée par la tension de surface du liquide et la pression autour du système entre autres, elle commence sa phase d'effondrement qui génère aussi du cisaillement [77, 78]. Cependant, selon le rayon atteint par la bulle pendant l'expansion, il est possible d'observer une génération d'onde de choc acoustique après l'effondrement [79]. Cette phase d'effondrement est d'autant plus complexe avec la présence d'une frontière rigide ou élastique à proximité de la bulle. Les effets de bords induisent une rupture de symétrie qui peut générer des phénomènes comme des jets de liquide dégradant les surfaces à proximité, en l'occurrence, une membrane cellulaire ou le bord d'un canal microfluidique par exemple [159, 227, 228].

Ces phénomènes, accentués en milieux biologiques [80], peuvent être une cause de mortalité lors du traitement de cellules. En effet, les pressions mesurées au voisinage des nano-bulles en cavitation augmentent avec leur rayon maximal qui peut être modulé avec la fluence laser [81, 229] tandis que le cisaillement décroît avec la distance d'observation [83]. En d'autres termes, au voisinage des sites de nucléation, les contraintes et déformations sont suffisamment importantes pour un rayon de nano-bulle critique (indirectement pour une fluence donnée) pour compromettre la survie de la cellule [77, 147]. L'existence d'un optimum de distance entre effet

de jets et cisaillement existe pour des nanoparticules isolées [111]. À noter que nombre de ces études ont été effectuées sur des nanoparticules isolées mais des parallèles avec des configurations en suspension indiquent une similarité des comportements.

Augmentation de la densité cellulaire et amélioration de fréquence de photoporation

L'introduction dans le chapitre précédent de la composante fluidique de la photoporation en flux impose une contrainte de cadence. En effet, le taux de répétition du laser et sa géométrie sur l'échantillon imposent des débits microfluidiques limités pour ne pas dépasser $v_{\max} \sim 10$ cm/s. L'augmentation du nombre de cellules traitées par unité de temps est donc possible en adaptant la concentration de la suspension de cellules injectée en amont de la puce microfluidique. La confluence élevée des cellules en culture et leur concentration élevée dans le réservoir d'injection entraîne d'une part la formation d'agrégats cellulaires et d'autre part la sédimentation pendant le passage en flux. Ces deux phénomènes détériorent la performance de la photoporation tant sur l'aspect temporel que l'efficacité de perméabilisation.

La dispersion des cellules dans le réservoir d'injection influe directement sur la cadence de passage des cellules. Pour une suspension homogène, le nombre de cellules par unité de temps reste stable. Dans le cas de la sédimentation, la concentration ambiante varie selon la position à laquelle se produit la prise de flux (extrémité du tube dans le réservoir). Le nombre de cellules diminue en s'éloignant de la base du tube dans le temps. À cette base, l'accumulation des cellules et la formation d'un culot entraîne également la formation d'agrégats cellulaires supplémentaires en présence d'électrolytes.

Les agrégats faussent ainsi le nombre de cellules détectées en flux (mesure utilisée pour la viabilité) et peuvent également limiter l'effet de l'excitation des nanoparticules dans les configurations désirées de photoporation à distance. Puisque leur taille n'est pas contrôlée, le nombre de cellules les constituant et leur disposition par rapport aux contraintes mécaniques et aux ondes de chocs ne sont pas maîtrisés. La dissociation des cellules et la limitation des agrégats sont donc nécessaires pour améliorer l'organisation de l'écoulement cellulaire dans le cadre de la photoporation à distance.

Il existe des formulations commerciales très courantes en cytométrie en flux conçues spécifiquement pour la limitation de l'agrégation. Mais la complexité du traitement par photoporation et son effet sur la membrane des cellules peuvent varier avec l'usage d'agents chimiques supplémentaires. En effet, avec l'exemple courant du mélange Trypsine/EDTA, le premier permet de dénaturer certains acides aminés telles que les lysines, responsables de l'adhésion au substrat de culture. Le second est un chélateur des ions Ca^{2+} impliqués dans la réparation des membranes, entraînant ainsi une rupture des cadhérines impliquées dans les interactions intercellules [170, 230, 231].

En éliminant le milieu complet et le sérum foetal de veau au profit du tampon phosphate salin sans Ca^{2+}, Mg^{2+} (DPBS(- - -)), tout apport d'ions Ca^{2+}, Mg^{2+} est limité pendant le passage en flux. Le rinçage en amont de la mise en suspension est lui aussi important afin d'éliminer les débris d'ADN qui peuvent favoriser les interactions entre cellules. Les agrégats sont également limités notamment en adaptant les étapes de préparation d'échantillon avant passage en flux : dissociation mécanique (aspiration-refoulement à l'aide d'une pipette), vitesse intermédiaire de centrifugation pour la re-concentration après remise en suspension des cellules en culture .

En ce qui concerne l'appareillage microfluidique, des exemples dans la littérature proposent des techniques de dissociation de cellules à l'aide de forces de cisaillement lors d'écoulement dans des tubulures [232]. En se

basant sur cela, l'acheminement des cellules s'est donc fait *via* des tubulures de diamètre de 250 µm et de longueur ≈ 70 cm avec une constriction 150 µm de diamètre dans le parcours créé par le débit-mètre utilisé de façon à localement augmenter le cisaillement. Enfin, quant à la sédimentation pendant le passage en flux, le réservoir d'injection a été mis sous agitation modérée sans perturber l'écoulement.

En implémentant les méthodes microfluidiques d'organisation de nanoparticules exposées dans le chapitre 4, il nous est possible de moduler les deux paramètres cité ci-dessus : la fluence laser d'excitation et la distance entre cellule et sites de nucléation des nano-bulles de vapeur. Nous allons exposer différentes approches qui vont successivement réaliser un contrôle de la séparation de ces deux phases.

2 Matériels et Méthodes : Photoporation en flux avec séparation

La photoporation en flux avec les nanoparticules au voisinage des cellules confirme la génération de nano-bulles (voir chapitre 3). Les résultats numériques obtenus par simulation des écoulements dans une puce à géométrie de focalisation sont exploités pour organiser les suspensions de cellules et de nanoparticules pendant l'irradiation (voir chapitre 4).

La lignée cellulaire (cellules HeLa), la fluence laser (~ 2.6 J/cm^2), la molécule exogène (FITC-Dextran 10 kDa à 2 mg/ml) et les nanoparticules (d'or sphériques de diamètre 70 nm) sont utilisées dans le protocole de photoporation en flux à distance et les résultats sont comparés aux performances obtenus avec la photoporation en flux. Puisque la génération de nano-bulles est avérée, le paramètre d'intérêt est la distance entre les flux de cellules et de nanoparticules. Sa variation permet l'optimisation des paramètres clefs de la photoporation : la fraction positive et la viabilité cellulaire.

2.1 Dispositif opto-fluidique pour la photoporation en flux à distance

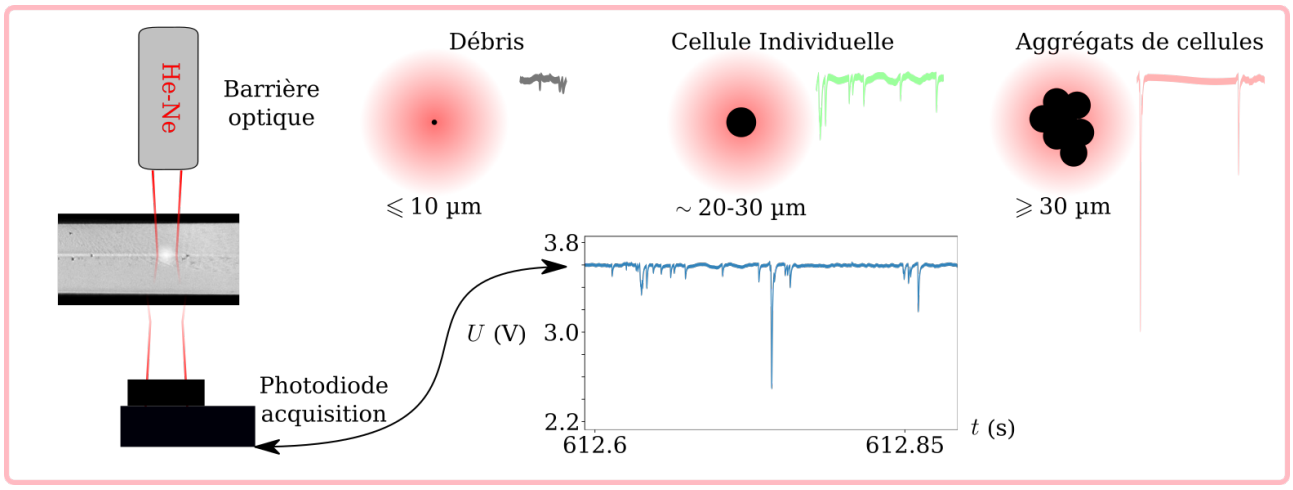
Le dispositif opto-fluidique est constitué d'un laser Q-switch de photoporation, d'un laser $He-Ne$ pour le suivi temporel de l'écoulement cellulaire et d'une puce microfluidique où s'effectue l'irradiation de l'échantillon par le laser de photoporation. La structure du dispositif optique reste identique. La puce microfluidique est une géométrie de focalisation hydrodynamique à deux niveaux, *i.e.* quatre entrées latérales symétriques deux à deux en aval de l'entrée centrale.

Le flux porteur de cellules est à un débit de l'ordre de 5 µl/min parcourant 70 cm dans des conduits de diamètre intérieur 250 µm. Les temps caractéristiques d'établissement du régime permanent de l'écoulement fluidique sont ainsi d'une dizaine de minutes. Avec des confluences élevées, la dissociation des cellules est réalisée dès les étapes de préparation de l'échantillon et nécessite des adaptations du circuit fluidique les acheminant à la zone d'irradiation. Pour la maintenir, les ions pouvant favoriser les interaction inter-cellules sont éliminés. Par ailleurs, la sédimentation dans le réservoir est accélérée aux concentrations de travail. L'isolation des cellules pendant l'écoulement et l'irradiation se dégrade alors dans le temps.

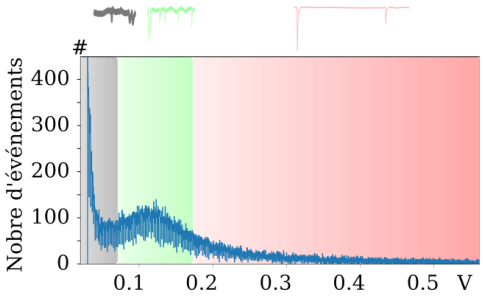
Le passage des cellules est mesuré avec un faisceau $He-Ne$ focalisé qui est renvoyé sur une photo-diode (fig.5.1a). Le signal temporel converti par la photo-diode en tension renvoie trois informations. Le nombre d'extinction donne le nombre de cellules passées en flux. La largeur des extinctions dépend de la vitesse d'écoulement. Enfin, leurs amplitudes sont liées à la taille de l'objet. Les pics d'intérêt pour le comptage en temps réel sont donc des signaux issus du passage d'objets d'une taille de ~ 30 µm, la taille typique d'une cellules HeLa en suspension.

La tension dépendant de l'énergie optique varie selon la section du faisceau écrantée. La surface occupée par l'objet induit donc une extinction dont l'amplitude dépend de sa taille (fig.5.1a). Sur un passage en puce de cellules, les signaux bruts distinguent trois types d'objets : les débris, les cellules individuelles et les agrégats de cellules (fig.5.1c). Si les débris peuvent fausser le comptage de cellules en temps réel, ils peuvent néanmoins être filtrés avec le seuillage adéquat sur la distribution des amplitudes des signaux acquis (fig.5.1b). La détection des agrégats permet d'estimer la qualité de l'écoulement cellulaire et d'éventuellement dissocier manuellement la suspension mère (aspiration et refoulement dans le réservoir d'injection).

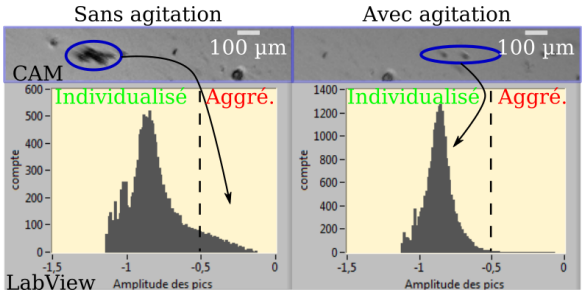
La puce microfluidique est obtenue par microfabrication d'un système verre-Si-verre (cf fig.3.3 Chapitre 3 et fig.D.1 en annexe D) en utilisant une géométrie avec deux niveaux de focalisation hydrodynamiques dans le



(a) Type de signal selon taille



(b) Distribution d'amplitude du signal brut



(c) Visualisation en temps réel (Labview et caméra) de l'écoulement

FIGURE 5.1 – **Détection d'agrégats cellulaires pendant l'écoulement de cellules dans la puce microfluidique.**
L'augmentation de la densité de cellules dans la solution mère injectée dans la puce microfluidique favorise la création d'agrégats cellulaires. Ces objets peuvent obstruer les canaux microfluidiques d'entrée et de sortie et diminuer les performances de la photoporation par écrantage (les cellules périphériques par rapport à celles au centre de l'agrégat). La caractérisation de l'écoulement et de la présence d'agrégats (objets de taille supérieure à ~ 30 µm) se fait par barrière optique. **Fig.a)** Types d'objets observés à la barrière optique à partir de la tension mesurée par la photodiode pendant l'écoulement de cellules (signal brut). Les pics de tension sont filtrés par seuillage pour éliminer les débris (objets de petites tailles). L'amplitude de la chute de tension créée par l'extinction partielle du laser $He-Ne$ permet de caractériser la taille de l'objet de passage. Par ordre de taille, la barrière détecte des débris (éliminés par seuillage), des cellules individuelles (pics d'intérêt) et des agrégats. Selon la présence de ces derniers, l'échantillon injecté est agité pour limiter leur formation ou changé si la fraction est trop importante. **Fig.b)** Histogramme du signal brut permettant de discriminer la taille selon l'amplitude des pics d'extinction. La distribution est obtenue avant le seuillage pour éliminer les débris. Le seuil est fixé arbitrairement et ajusté selon le nombre d'événements détectés est vérifié par imagerie. **Fig.c)** Sorties graphiques du programme LabView permettant un suivi en temps réel de la présence d'agrégats ou de débris lors du passage en flux d'une suspension de cellule. Si la distribution des valeurs de tension est étroite, il y a peu d'agrégats en écoulement. La visualisation en temps réel permet d'évaluer le nombre de cellules par agrégats. Arbitrairement, s'il y a moins de 10% d'agrégats constitués d'une dizaine de cellules parmi les objets détectés, l'échantillon est maintenu et l'irradiation effectuée.

même plan. L'entrée centrale et le premier niveau de focalisation hydrodynamique, respectivement S, A_1 et A_2, injectent les suspensions actives impliquées dans la photoporation en flux à distance en séparation (cellules, nanoparticules et flux séparateur). Le deuxième étage de focalisation, B_1 et B_2 injectent des solutions tampon comme liquide de gaine pour focaliser les flux injectés en amont (fig.5.2). La puce comporte trois sorties permettant la récolte séparée des lignes de courant du canal principal.

L'écoulement est contrôlée en débit en réalisant un asservissement des unités de pression. La mise en flux initiale est constituée d'une séquence de surpressions dans le réservoir de la suspension cellulaire. Cela a pour but de raccourcir le temps d'établissement du régime permanent d'écoulement des cellules. La densité cellulaire élevée favorise la sédimentation de la suspension et détériore la cadence de l'écoulement cellulaire dans le temps. La séquence de surpressions permet de passer rapidement le régime transitoire pour débuter l'irradiation et l'extraction des échantillons. Pour minimiser la variabilité échantillon à échantillon, pour chaque solution mère mise en écoulement, plusieurs conditions sont réalisées. Pour limiter la sédimentation, le réservoir de cellules est mis sous agitation modérée pour maintenir le nombre de cellules par unité de temps et donc les durées d'extraction. Les échantillons sont ainsi uniformisés (voir fig. F.1b en annexe F).

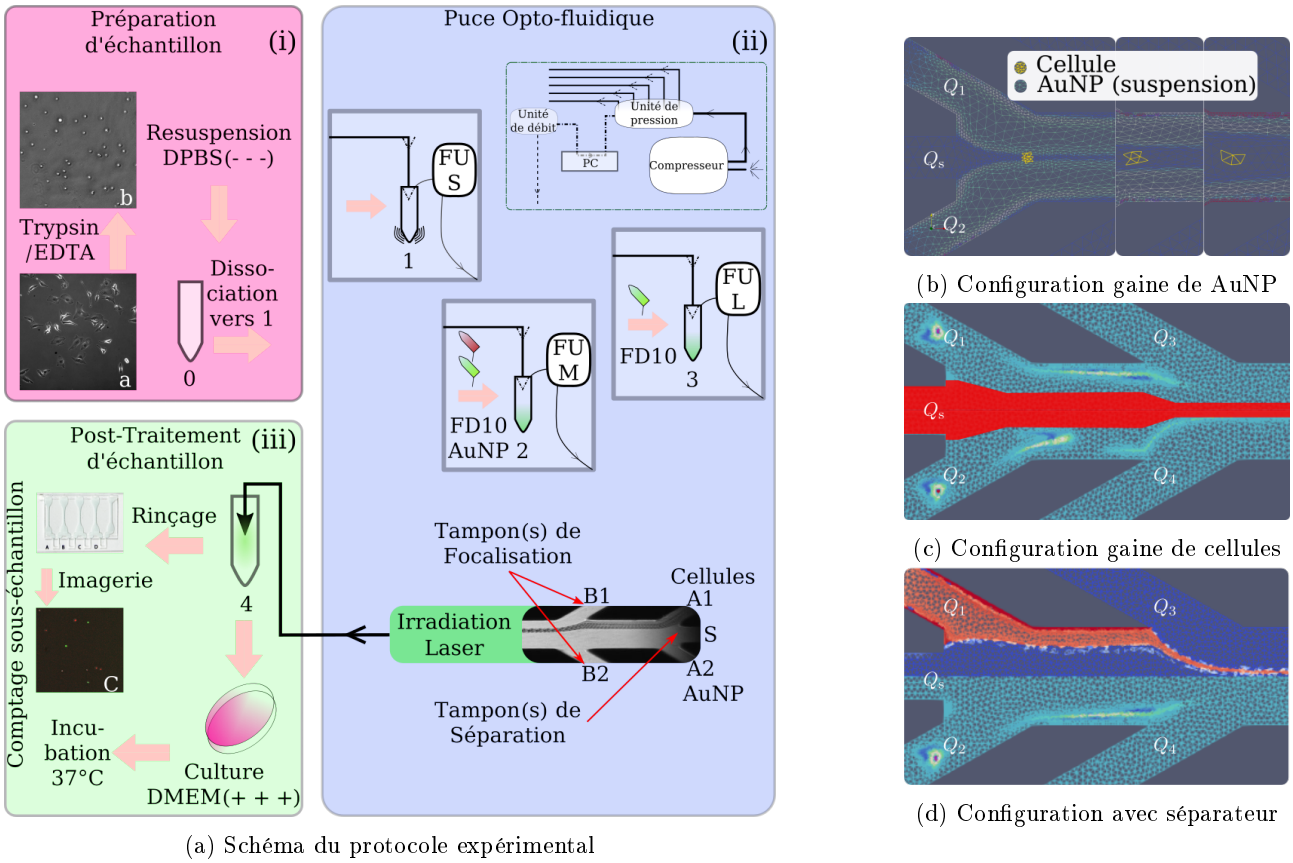
Pour diminuer la présence d'agrégats pendant la préparation de l'échantillon, une dissociation mécanique est appliquée pendant la préparation de l'échantillon. La mise en agitation ralentie leur formation pendant l'extraction. Tout apport d'ions Ca^{2+}, Mg^{2+} pendant le passage en flux est limité en éliminant le milieu complet et le sérum foetal de veau au profit du (DPBS(- - -)). Enfin, fluidiquement, l'acheminement des cellules se fait *via* des tubulures de diamètre de 250 µm et de longueur $\approx$ 70 cm avec une constriction de diamètre (150 µm) dans le parcours que contient le conduit du débit-mètre utilisé. Ainsi, le cisaillement est augmenté de façon locale. Cela réalise la dissociation des éventuels agrégats formés dans le réservoir.

2.2 Photoporation de cellules à distance : les différentes approches

Deux flasques de 75 cm^2 (T75) confluentes à $\geqslant$ 80% de cellules HeLa WT entre les treizième et vingtième passages sont traitées dans 1 ml de Trypsine/EDTA pendant 5 min en incubateur (37 °C,5%CO_2). Les cellules sont remises en suspension avec 9 ml de milieu complet à base de milieu Eagle modifié de Dulbecco contenant 4.5 g/l de glucose, L-glutamine, penicilline-streptomycine et du sérum fœtal de veau (DMEM(+ + +)). Les deux suspensions sont centrifugées dans des tubes de 15 ml à 500 tr/min pendant 3 min à température ambiante pour former des culots et ensuite aspirer le surnageant, constitué de DMEM(+ + +). Les culots sont remis en suspension dans un volume final de 4 ml de tampon phosphate salin sans calcium ni magnésium (DPBS(- - -)) et dissociés avec une micro-pipette 1000 µl. L'élimination du DMEM(+ + +) et des ions Ca^{2+} et Mg^{2+} ne favorise pas les liaisons inter-cellules et la formation d'agrégats de cellules après leur dissociation. Les suspensions de cellules sont alors transférées dans le tube de solution mère (tube **0** de la fig.5.2a**(i)**).

Un volume de 3.5 ml de la solution mère est transféré dans le réservoir microfluidique (tube **1** de la fig.5.2a**(ii)**). Après aspiration et refoulement avec une pipette pour garantir la dissociation et la remise en suspension, le réservoir est connecté à l'appareillage microfluidique à l'entrée et mis sous agitation modérée. La suspension de cellules est alors injectée sans contenir du FITC-Dextran 10 kDa. Comme pour la photoporation en flux (chapitre 3), l'exomolécule n'est en solution que dans les autres flux porteurs (latéraux et central) à la concentration de 2 mg/ml dans du tampon phosphate salin sans calcium ni magnésium à 4.5 g/l de glucose DPBS(- - +) (tubes **2,3** de la fig.5.2a**(ii)**). L'absence de l'exomolécule du réservoir de départ évite qu'une incorporation passive de l'agent fluorescent se produise pendant la mise en flux avant l'irradiation par le laser de photoporation. Les contributions d'incorporations parasites en amont de l'irradiation au signal de fluorescence sont ainsi limitées. Enfin, la mise en flux dans un tampon DPBS(- - -) des cellules est compensée par l'apport en glucose des autres flux par l'ajout de milieu complet dans le tube de sortie à la fin de l'extraction (protocole en annexe F).

La puce microfluidique est préalablement mise en milieu avec du DPBS(- - -) contrôlé en débit. Les débits sont fixés à 5 µl/min pour les flux porteurs de cellules et de nanoparticules à débit total fixé à 120 µl/min.



(a) Schéma du protocole expérimental

(b) Configuration gaine de AuNP

(c) Configuration gaine de cellules

(d) Configuration avec séparateur

FIGURE 5.2 – **Protocole et configurations de photoporation en flux à distance.**
Les étapes préliminaires et de post-irradiation sont quasi identiques à celles exposées dans la fig.3.2 du Chapitre 3. **Fig.a)** Des cellules HeLa WT adhérentes en culture (image **a**) sont traitées avec 1 ml de Trypsine/EDTA et resuspendues (image **b**) après centrifugation dans du DPBS(- - -) (tube **0** : solution mère). Le tube 0 est transféré dans le tube **1** après aspiration et refoulement avec une pipette et ce dernier est connecté aux tubulures à l'entrée désirée (latérale ou centrale selon configuration). Le tube de la solution mère est mis sous agitation modérée pour éviter la sédimentation. Les tubes **1** contenant les cellules et **2** (4 tubes) contenant du FITC-dextran en solution dans du DPBS(- - +) avec ou sans nanoparticules sont reliés à la puce avec des tubulures adaptées particulièrement pour le flux porteur de cellules (diamètre réduit pour dissocier les agrégats [232]). Après le passage puce et le traitement lasser, l'échantillon est récupéré dans le tube **4** pour suivre les mêmes étapes de post-traitement que dans le Chapitre 3 (rinçage, marquage, comptage et remise en culture). **Fig.b)** Configuration fluidique pour obtenir une gaine de nanoparticule en flux entourant les cellules à traiter. Dans cette configuration, les deux fronts de nanoparticules sont donc susceptibles de créer des nanopores surs les deux côtés de la membrane cellulaire. En revanche, le maximum d'intensité du faisceau laser est orienté sur les cellules et non sur les nanoparticules. **Fig.c)** Configuration avec double apport de cellules pour optimiser l'excitation de nanoparticules. Ces dernières sont injectées par le canal central dans la puce microfluidique est sont alors irradiées par le maximum d'intensité du faisceau laser. La présence de deux fronts de cellules n'augmente pas la fraction positive à proprement parler mais la fréquence de traitement est multipliée par deux en exploitant l'émission sphérique des contraintes (onde de pression, oscillation de la bulle...). **Fig.d)** Configuration avec front unique cellule-nanoparticule pour l'étude de la variation de distance entre ces dernières. À débit total fixé, le débit du flux central est varié. Les cellules et les nanoparticules sont injectées séparément par les entrées latérale du premier étage de focalisation. Pour une puce de 800 µm et avec un débit de 120 µl/min, une variation de 1 µl/min de débit du séparateur à débit total constant permet un décalage de $\approx 6-7$ µm. Ainsi, les cellules sont éloignées ou rapprochées du flux porteur de nanoparticules irradiées par le maximum d'intensité du faisceau laser.

Trois impulsions laser sont ainsi émises pour s'assurer de l'irradiation de tout l'échantillon en écoulement en cas de fluctuation de débit. Après la procédure de mise en flux des solutions d'intérêt et des flux de gaine, le laser de photoporation est activé après établissement du régime permanent de l'écoulement. Le faisceau laser est positionné dans le canal principal au voisinage des flux porteurs de nanoparticules. Selon la configuration

choisie (gaine, séparateur), les intermédiaires plasmoniques sont irradiés avec différentes intensités.

Les nanoparticules sont introduites séparément (tubes **2** de la fig.5.2a**(ii)**) sous forme de suspension dans 3.5 ml de DPBS(- - +) à $8 \cdot 10^7$ part./ml. La géométrie microfluidique (2 niveaux de focalisation) maintient les deux flux (cellules et nanoparticules) sans contact pendant l'écoulement en amont et aval de l'irradiation. Les entrées choisies dépendent de la configuration des cellules et des nanoparticules pendant le processus de photoporation. De cette manière, il est possible de récolter un échantillon biologique sans nanoparticules après irradiation en exploitant une sortie triple : le canal principal abouti sur trois sorties. L'écoulement laminaire maintient les deux phases séparées et dirigées vers des sorties distinctes. Ces dispositions ne sont pas mises en place pour le moment.

Approche gaine de nanoparticules (fig.5.2b)

Les nano-bulles sont générées de part et d'autre des lignes de courant portant les cellules en injectant ces dernières en entrée centrale et les suspensions de nanoparticules par les deux entrées du premier niveau de focalisation. Le deuxième niveau de focalisation hydrodynamique sert à moduler, à débit total fixé, la largeur de la distribution de nanoparticules et donc le nombre de nanoparticules par unité de temps. La densité de nanoparticules à concentration donnée varie également avec la largeur du flux (paramètre fixé). Le laser est par conséquent centré sur le système nanoparticules-cellule-nanoparticules dans l'axe transversal du canal. Le maximum d'énergie est donc positionné au niveau des cellules. Le flux central faisant 60 µm de large, les nanoparticules sont ainsi irradiées par une intensité supérieure à $I_{\max}/2$, dans la gamme de génération de nano-bulles.

L'entrée centrale S de la puce accueille le tube **1** (suspension de cellules dans du DPBS(- - -)). Les entrées latérales intérieures (notées A_1 et A_2) reliées aux tubes **2** acheminent une suspension de nanoparticules d'or à $8 \cdot 10^7$part./ml dans du DPBS(- - +) (sans Ca^{2+}, Mg^{2+}) avec 4.5 g/l de glucose) avec du FITC-dextran 10 kDa dissous (2 mg/ml). Les entrées B_1 et B_2 (latérales extérieures) sont alimentées par une solution de FITC-dextran à la concentration nominale dans du DPBS(- - +). La consigne de débit pour S, A_1 et A_2 est fixée à 5 µl/min. Les débits B_1 et B_2 sont de 50 µl/min et modifiables si nécessaire pour élargir la distribution de nanoparticules dans l'axe transverse du canal. Le faisceau laser est positionné au centre du canal et son pic d'intensité coïncide avec le flux porteur de cellules.

Approche nanoparticules centrées (fig.5.2c)

Les nanoparticules sont irradiées par le maximum d'intensité du laser en les injectant dans le canal central. Les cellules sont injectées *via* un premier niveau de focalisation. Les deux porteurs de cellules entourent ainsi les sites de génération de nano-bulles de vapeur où les contraintes hydrodynamiques agissent dans les deux directions (émission acoustique sphérique). Le deuxième niveau de focalisation permet de focaliser l'écoulement des deux suspensions pour le confiner dans la zone irradiée par $I \geqslant I_{\max}/2$ et d'organiser les cellules spatialement sur l'axe de l'écoulement. La modulation du débit central en compensant par les débits du deuxième niveau de focalisation permet d'éloigner les cellules des nano-bulles générées par le maximum d'intensité.

Cette configuration inverse les entrées centrales de la puce, à savoir, les nanoparticules en S et les cellules en A_1 et A_2, toute chose restant égale par ailleurs. Ainsi, le maximum d'intensité du laser coïncide cette fois avec le centre de la distribution de nanoparticules en central et n'est pas absorbé par les cellules. L'injection de deux flux porteurs de cellules optimise la génération de nano-bulles de vapeur qui se fait dans les deux directions par rapport aux nanoparticules.

Approche front unique avec séparateur (fig.5.2d)

La distance entre les sites de génération de nano-bulles de vapeur et les cellules est contrôlée par un flux séparateur. Une solution tampon est injectée dans le canal central. Les cellules et les nanoparticules sont injectées séparément via le premier niveau de focalisation. Le deuxième niveau de focalisation permet le confinement de l'écoulement. Le débit de l'entrée côté cellules de ce niveau est varié à l'opposé du débit centrale pour décaler les lignes de courant porteuses de cellules à débit total fixé. La distance est ainsi contrôlée par incrément de débit.

L'entrée centrale S est maintenant alimentée par une solution de FITC-dextran dans du DPBS(- - +). Les entrées A_1 et A_2 sont reliées respectivement aux réservoirs de cellules et de nanoparticules. Les flux porteurs B_1 et B_2 restent inchangés et servent à focaliser les flux centraux (S et A_i). Le laser est positionné sur le flux A_2 porteur de nanoparticules. La variation du débit S compensée par celle du débit B_1 permet de modifier la distance entre cellules et nanoparticules excitées sans perturber la largeur des leurs flux porteurs respectifs. Des incréments typiques de 1 µl/min sont effectués.

2.3 Protocole post-photoporation : préparation d'échantillon et analyse des données

Les échantillons passés en flux avec ou sans irradiation sont récoltés dans des tubes 15 ml (tube **4** de la fig.5.2a). À la fin de l'extraction de 1 ml de suspension irradiée, 10 ml de milieu de cultures sont ajoutés après 5 min (après réparation des membranes) pour diluer le FITC-Dextran non incorporé. Les tubes sont mis en incubation avant l'étape de rinçage. Les échantillons sont alors préparés suivant le protocole développé dans le chapitre 3 avant la première visualisation et la remise en culture.

Des images sont prises dans les chambres de visualisation et après remises en culture à l'aide des objectifs 4x et 20x comme effectué pour la photoporation en flux (cf fig.3.5 Chapitre 3). Elles permettent de mesurer la fraction positive à $J0$ et $J+1$ en faisant le rapport entre le nombre de cellules positives au FITC-Dextran et le nombre total de cellules. Les images avec l'objectif 20x (avec un marquage Hoechst 24 h après le traitement pour simplifier la détection des noyaux) donnent l'efficacité d'incorporation à $J+1$ en mesurant la fluorescence intracellulaire. Les différentes grandeurs de viabilité comme les facteurs de survie et de croissance ainsi que les grandeurs liées à la population des cellules rondes sont obtenues à partir des images en lumière blanche.

3 Résultats et Discussion : Photoporation à distance

La pré-incubation des cellules adhérentes avec nanoparticules permet la répartition de ces dernières sur toute la surface de la membrane en contact avec la solution de FITC-Dextran. La création de nanopores par photoporation se fait donc sur toute la surface utile. Dans le cas de la photoporation en flux également, la suspension cellules-nanoparticules est homogène et les nanopores sont induits sur une surface voisine de la surface de la membrane cellulaire. Dans le cas de la séparation des cellules et des nanoparticules (fig.5.2), la génération de nano-bulles ne se fait pas tout autour des cellules. Par ailleurs, l'irradiation par le laser n'optimise pas dans certains cas la fluence apportée aux intermédiaires plasmoniques.

Des cellules HeLa sont remises en suspension et passées en flux. Les trois configurations d'injection des suspensions de cellules et de nanoparticules sont testées dans un premier temps et évaluées par leur fraction positive globale. Elles se font toutes les trois lors d'un passage en puce avec un canal principale de 800 µm de large en appliquant un débit total de 120 µl/min dans une puce.

Les flux porteurs de nanoparticules à une concentration de $8 \cdot 10^7$part./ml sont ainsi irradiées par trois impulsions. La fluence est fixée telle que $I_{\max} \sim 2.6$ J/cm^2 au taux de répétition 10 Hz. L'objectif est de déterminer la dépendance entre distance et fraction positive tout en intégrant la viabilité des protocoles de photoporation à distance.

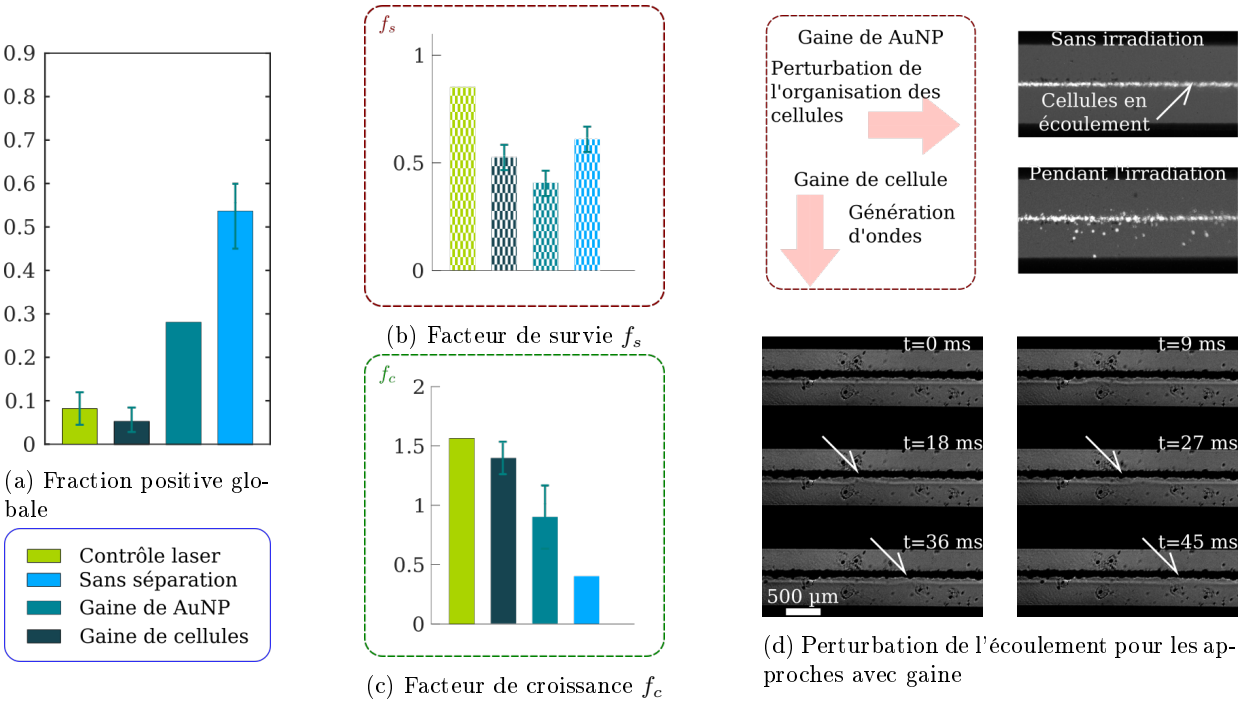
3.1 Contrôle de la distance cellule-nanoparticules pendant la photoporation avec séparation

Les trois méthodes d'organisation des écoulements de nanoparticules et de cellules permettent le contrôle de la distance entre les deux phases. Les méthodes sans séparateur, nanoparticules en gaine ou centrées, sont identiques fluidiquement (mêmes valeurs de débit dans les entrées) et ne diffèrent que par l'attribution des porteurs. Ces deux méthodes ont cependant deux sortes de limites. La première intervient pendant la phase d'irradiation et le positionnement du laser par rapport au nanoparticules. La deuxième intervient après irradiations puisque la viabilité cellulaire est altérée par l'amplitude des nano-bulles de vapeur ou les perturbation du flux générées.

3.1.1 Approche avec gaine de nanoparticules et fluence

La photoporation par nanoparticules en gaine perméabilise $\approx 25-30\%$ de l'échantillon passé en flux (fig.5.3a). Cette fraction positive est inférieure à celle obtenue par la photoporation en flux ($\sim 50\%$, résultats des chapitres 2 et 3). Dans cette configuration où le maximum de fluence coïncide avec le porteur de cellules, les nanoparticules sont excitées à moindre fluence $I_- \approx 1.9$ J/cm^2 $> I_{\mathrm{VNB}}$ par rapport à la photoporation en flux puisqu'elles se trouvent à $\approx\ 25-30$ µm. Par conséquent, la génération de nano-bulles est réalisée. La baisse de l'efficacité de perméabilisation n'est pas une conséquence d'un effet photo-thermique ou une vitesse d'écoulement rapide par rapport au taux de répétition du laser puisque l'irradiation se fait avec trois impulsions laser.

La gaine de nanoparticules irradiée génère des nano-bulles de vapeur sur deux fronts entourant le flux central porteur de cellules. Cette gaine est éclairée par un faisceau elliptique orienté suivant l'écoulement. Pour une concentration de nanoparticules en suspension donnée, chaque irradiation peut créer $2 * N_{\mathrm{AuNP}}$ nanopores par membrane cellulaire (soit au maximum $\sim 100-300$). Cependant, le flux porteur de cellules est perturbé en corrélation avec les irradiations par le laser (fig.5.3d). Ce phénomène déjà observé pour la photoporation en flux désorganise donc l'écoulement cellules-nanoparticules. Malgré la présence de nanoparticules, l'incorporation est



(a) Fraction positive globale

(b) Facteur de survie f_s

(c) Facteur de croissance f_c

(d) Perturbation de l'écoulement pour les approches avec gaine

FIGURE 5.3 – **Perméabilisation de cellules par photoporation avec séparation à distance nulle : gaine de cellules et gaine de nanoparticules (AuNP).**
Une suspension de cellules est mise en flux dans une puce microfluidique avec un canal central de 800 µm de large à un débit de 120 µl/min. La photoporation se fait avec une gaine de nanoparticules (cellules en centrale et deux flux latéraux porteurs de AuNP) ou avec une gaine de cellules (nanoparticules en central et deux flux porteurs de cellules). Ces deux approches sont donc à phases séparées (cellules et AuNP non mélangées) contrairement à la photoporation en flux. **Fig.a)** Fraction positive globale de la photoporation avec séparation mesuré à $J+1$ après irradiation en flux. La photoporation par nanoparticules en gaine perméabilise $\approx 25-30\%$ de l'échantillon passé en flux alors que l'approche avec les cellules centrées résulte en un marquage de $\sim 10\%$ comparable aux résultats obtenus lors du contrôle laser (irradiation en flux sans AuNP). Ces deux valeurs sont inférieures à celle obtenue dans le cas de la photoporation en flux sans séparation $\sim 54\%$. **Fig.b)** Le facteur de survie f_s qui décrit la viabilité de la photoporation avec gaine de AuNP vaut $(41\pm6)\%$ alors que la photoporation de cellules avec les nanoparticules centrées réalise $(52\pm6)\%$ de cellules viables après traitement. En comparaison, la photoporation en flux permet de récupérer 60% de cellules viables après irradiation en flux. La viabilité à $J0$ et la fraction positive à $J+1$ des deux approches avec séparation sont faibles. **Fig.c)** Les facteurs de croissance des approches à très petites distances (en flux ou avec gaine) restent en dessous de l'unité ce qui veut dire que la reprise de croissance est fortement ralentie et qu'une fraction de la population meurt entre la remise en culture à $J0$ et l'imagerie à $J+1$. **Fig.d)** Des perturbations de l'organisation des cellules se produisent pendant l'écoulement quand le faisceau laser irradie l'échantillon. Dans le cas de l'approche par gaine de nanoparticules, le maximum de fluence irradie directement les cellules et les parois du canal (haute et basse). L'interaction du laser avec le substrat en verre se manifeste sur la dispersion des cellules en écoulement. Dans le cas de la gaine de cellules avec les nanoparticules centrées, on observe la génération d'un front de déplacement le long du porteur de nanoparticules qui se propage dans la direction du flux à une vitesse de ~ 3 cm/s. Ces deux éléments expliquent en partie la faible fraction positive (pas de contrôle lors de la génération de nano-bulles) et la viabilité basse (contraintes hydrodynamiques supplémentaires).

limitée car les cellules sont dispersées de leur trajectoire initiale et les nano-bulles de vapeur sont alors sans effet pour la photoporation.

Par conséquent, le maximum de fluence doit être éloigné des cellules que cela soit pour limiter leur exposition ou les éloigner des perturbations d'écoulement générées par l'interaction entre le laser et le substrat en verre. Le flux porteur de nanoparticules est ainsi centré sur le maximum de fluence du faisceau elliptique et est entouré de deux écoulements cellulaires. De cette manière, le maximum d'énergie optique réalise la résonance de plasmons de surface et les cellules ne sont pas irradiées.

3.1.2 Approche avec gaine de cellules et irradiation

La fraction positive obtenue ($\leqslant 10\%$) est comparable à celle obtenue sans irradiation laser. Cette configuration avec les nanoparticules centrées est similaire de l'approche ci-dessus à la répartition des nanopores près. La réduction du nombre de nanopores d'un facteur 4 améliore la fraction positive mesurée à $J+1$ (voir chapitre 3). Cela peut-être le résultat d'une viabilité très faible indiquant que seules les cellules perméabilisées fluidiquement (non-photoporées) survivent.

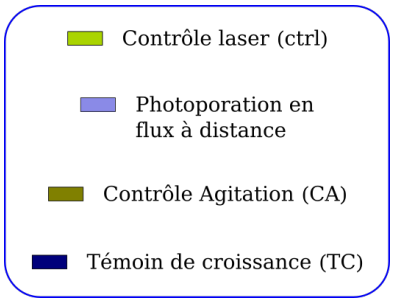
Cependant, pendant l'irradiation avec le laser du flux de nanoparticules, un front de déplacement est visible dans le flux porteur de cellules se propageant le long de l'écoulement à une vitesse de $\sim$ 3 cm/s. (fig.5.3). Cette perturbation vient alors désorganiser le flux et potentiellement placer les cellules dans des zones où les contraintes mécaniques d'origine acoustique sont insuffisantes pour perméabiliser les membranes. En effet, quand bien même le nombre de nanoparticules n'altère pas les seuils de générations de nano-bulles de vapeur, ce dernier reste suffisamment important, à l'échelle du faisceau d'irradiation, pour réaliser une cohérence spatiale et temporelle entre les ondes de pressions issues de la distribution de nanoparticules. Ces phénomènes conduisent potentiellement à l'observation en écoulement.

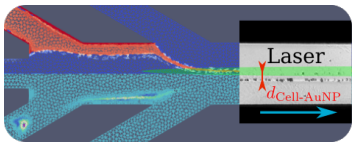
Mais contrairement à l'approche avec une gaine de nanoparticules, la fraction positive est comparable au contrôle flux. Il en vient que la perturbation observée dans la première approche limite la perméabilisation mais aussi place certaines cellules dans des zones avec une forte concentration de nanoparticules (décalage vers les porteurs latéraux) réalisant ainsi la photoporation en flux introduite dans le chapitre 3. Or dans la présente approche, l'éjection à l'opposé du flux central porteur de nanoparticules éloigne les cellules des contraintes mécaniques qui peuvent réaliser la perméabilisation.

La viabilité, mesurée par le facteur de survie f_s et le facteur de croissance f_c, est faible pour la photoporation avec gaine (fig.5.3b et c). L'irradiation des cellules centrées entraîne la mort $\sim 60\%$ de la population traitée. La configuration avec les nanoparticules centrées cause quant à elle la mort de $\sim 50\%$ des cellules. Le facteur de croissance inférieur à l'unité indique que le métabolisme des cellules traitées par les deux approches de photoporation en flux et avec gaine de nanoparticules est fortement impacté (~ 0.4 et ~ 0.8 respectivement). La photoporation avec cellules centrées, quant à elle, n'impacte pas autant le métabolisme avec un facteur de croissance de $\sim 1.4 \pm 0.1$, à l'instar du contrôle laser ($f_c \sim 1.6$). L'irradiation de la distribution de nanoparticules entraîne la perte de cellules mais n'impacte pas la croissance des survivantes. Conjugué à une très faible fraction positive, on en conclut que les cellules survivantes sont celles non perméabilisées. Les contraintes sont trop importantes et filtrent la population cellulaire.

Sur la base de ces observations, il est donc nécessaire de stabiliser l'écoulement pendant l'irradiation de l'échantillon. En d'autre terme, il faut éloigner les cellules des sites de générations de nano-bulles ou d'interaction laser-substrat (ici le verre). D'une part, la distance n'est plus contrôlée et donc les effets mécaniques ne sont pas maîtrisés. D'autre part, le dé-confinement des deux phases (nanoparticules et cellules) complexifie les étapes de tri et de maintien de la séparation.

3.2 Tampon séparateur pour contrôler la distance cellules-nanoparticules

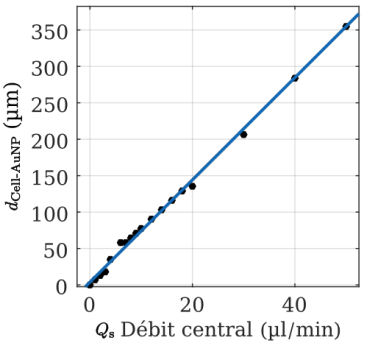




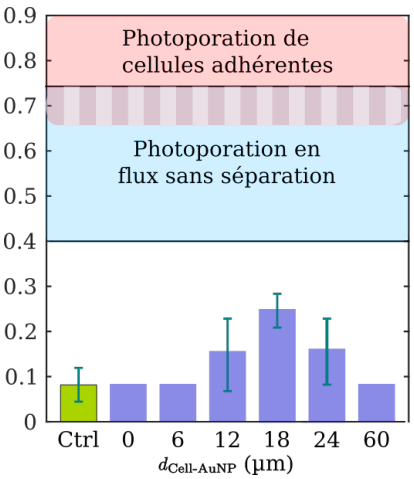
(a) Organisation des cellules et nanoparticules



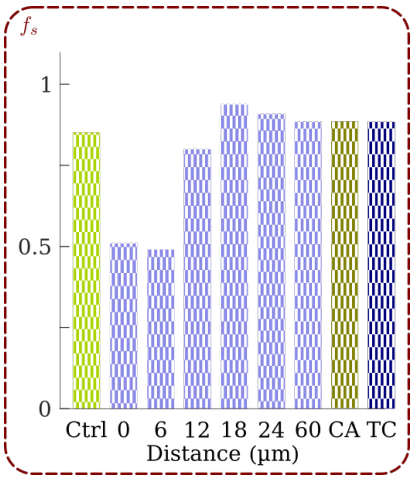
(b) Perturbation de l'écoulement pour les petites distances



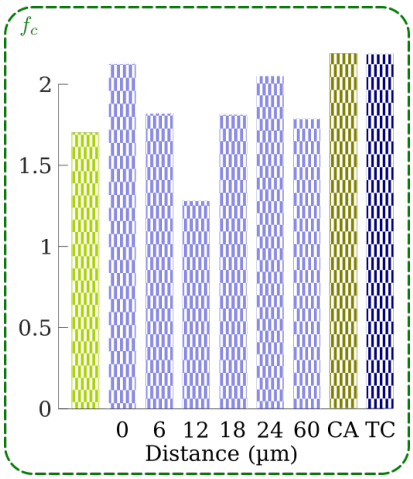
(c) Correspondance débit-distance entre cellules et nanoparticules



(d) Fraction positive en fonction de la distance



(e) Facteur de survie f_s en fonction de la distance



(f) Facteur de croissance f_c en fonction de la distance

FIGURE 5.4 – **Perméabilisation de cellules par photoporation en flux à distance avec séparateur.** Une suspension de cellules est mise en flux dans une puce microfluidique Verre-Si-Verre avec un canal central de 800 µm de large à un débit de 120 µl/min. La photoporation se fait avec un flux séparateur. Les cellules et les nanoparticules sont injectées *via* un premier niveau de focalisation. Le flux séparateur est injecté par le canal central. Le débit de ce dernier est couplé au débit du deuxième niveau de focalisation pour éloigner les cellules des nanoparticules. Le faisceau est positionné sur le flux porteur de nanoparticules. **Fig.a)** Configuration pour la modification de la distance entre les cellules et les sites de génération de nano-bulles (nanoparticules irradiées par le laser de photoporation). L'éloignement des cellules se fait par le changement des débits d'injections du flux central et d'un des flux latéraux externes (deuxième étage de focalisation). **Fig.b)** Apparition de perturbations de l'écoulement cellulaire à partir d'une distance $\sim$ 12 µm pour les petites distances. **Fig.c)** Correspondance entre le débit central (à débit total fixé à 120 µl/min) et la distance entre les cellules et le front de nanoparticules. **Fig.d)** Fraction positive globale obtenue à $J+1$ pour des échantillons photoporés à distance. Le taux pour chaque condition avec des barres d'incertitudes est la moyenne de deux réalisations. Les barres d'erreur représentent les deux valeurs obtenues. Il est de $\leqslant$ 10% pour les grandes et petites distances. Il présente un maximum de $\sim$ 25% pour $d_{\text{Cell-AuNP}} \sim$ 18 µm. De manière remarquable, la distance $d_{\text{Cell-AuNP}} \sim$ 18 µm est la seule valeur avec une fraction positive nettement plus importante que les contrôles. Les taux obtenus à distances sont faibles devant les valeurs de la photoporation de cellules adhérentes ou de photoporation en flux. **Fig.e)** Facteur de survie f_s mesuré à $J0$ après irradiation comparé aux échantillons témoins. De faibles valeurs sont observées pour les distances 0 et 6 µm, environ 50%, avant l'amélioration de la viabilité. À noter que l'augmentation du facteur de survie est obtenue avant celle de la fraction positive puisque $d_{\text{Cell-AuNP}} \sim$ 12 µm présente une meilleure viabilité de 75% pour une faible fraction positive. **Fig.f)** Facteur de croissance f_c des échantillons photoporés à distance comparés aux échantillons témoins. Les facteurs de croissances sont entre 1.5 et 2, excepté pour l'échantillon photoporé à $d_{\text{Cell-AuNP}} \sim$ 12 µm. Le métabolisme des cellules traitées avec le flux séparateur n'est pas autant impacté que dans le cas de la photoporation en flux (sans séparation) ou la photoporation avec gaine (fig.5.3).

Dans l'approche avec gaine de particules, la photoporation à distance est réalisée mais avec une fraction positive de l'ordre de $\sim 30\%$ (fig.5.3). Ce protocole ne favorise pas l'adsorption des nanoparticules aux cellules puisque les deux phases sont séparées en amont de la zone d'irradiation et ne sont voisines que pendant le parcours du canal central. Cependant, des perturbations de l'écoulement se produisent avec l'irradiation. D'une part, la séparation n'est pas garantie compte tenu des trajectoires de cellules observées qui peuvent conduire à un mélange avec le flux de nanoparticules (fig.5.3d). D'autre part, la distance cellules-nanoparticules peut varier entre 0 et quelques dizaines de micromètres. De ce fait, l'introduction d'un tampon séparateur vise à mieux contrôler les distances à l'aide de la consigne de débit du flux central (fig.5.4a).

3.2.1 Optimum de distance entre viabilité et perméabilisation

La variation des débits du flux séparateur et du flux de focalisation (S et B_1 en opposition) déplace le flux porteur de cellules par rapport au flux de nanoparticules à débit total constant. Le contrôle de la distance permet une variation de ~ 6 µm par incrément de ~ 1 µl/min (fig.5.4c). La photoporation à distance est réalisée pour des valeurs de $d_{\text{Cell-AuNP}}$ entre 0 et 60 µm sur des échantillons issus de la même solution mère lors d'un même passage en puce.

Qualitativement, le premier avantage de cette approche est la stabilisation de l'écoulement pour certaines valeurs de distances (fig.5.4b). En effet, l'éloignement du flux porteur de cellules du front de nanoparticules et de la zone d'irradiation permet de réduire les perturbations de l'organisation des cellules. Pour une distance de l'ordre de ~ 20 µm, l'irradiation par laser du front de nanoparticules présente moins d'effets négatifs. Les contraintes mécaniques subies par les cellules sont ainsi mieux définies en terme de distance des sites de génération de nano-bulles.

La fraction positive évolue avec la distance. Elle est de $\leqslant 10\%$ pour les grandes et petites distances. Elle présente un maximum de $\sim 25\%$ pour $d_{\text{Cell-AuNP}} \sim 18$ µm (fig.5.4d). De manière remarquable, la distance $d_{\text{Cell-AuNP}} \sim 18$ µm est la seule valeur avec une fraction positive nettement plus importante que les contrôles pour une réalisation. Moyennée sur deux répétitions, la portée des contraintes se situe autour de $d_{\text{Cell-AuNP}} \sim 18 \pm 6$ µm Cette valeur reste faible devant les fractions positives obtenues par les différentes approches exposées jusque là ($\sim 80\%$ pour la photoporation de cellules adhérentes, $\sim 50\%$ pour la photoporation en flux, $\sim 30\%$ pour la photoporation avec gaine de nanoparticules). Par ailleurs, la fraction obtenue pour la distance de ~ 24 µm est légèrement au dessus de celle obtenue pour la distance de ~ 12 µm. Il n'y a donc pas de symétrie par rapport à l'optimum, aux incertitudes de contrôle ou dues aux perturbations près.

Le taux de viabilité est dans un premier temps mesuré à $J0$ avec le facteur de survie (fig.5.4e). De faibles valeurs sont observées pour les distances 0 et 6 µm, environ 50%, avant l'amélioration de la viabilité. À noter que l'augmentation du facteur de survie est obtenue avant celle de la fraction positive puisque $d_{\text{Cell-AuNP}} \sim 12$ µm présente une meilleur viabilité de 75% pour une faible fraction. Au delà de cette distance, la viabilité semble varier entre ~ 80 et $\sim 90\%$ notamment à cause de l'effet de l'écoulement dans la puce microfluidique, des étapes de préparation d'échantillons en aval du traitement laser. La viabilité devient maximale à partir de $d_{\text{Cell-AuNP}} \sim 18$ µm, distance correspondant également à l'atténuation des perturbations observées pendant l'irradiation (fig.5.4b). De façon intéressante, l'autre grandeur décrivant la viabilité sur un plus long terme, le facteur f_c, est comparable entre échantillons photoporés et témoin de croissance (fig.5.4f). Contrairement à ce qui est obtenu dans le cas de la photoporation avec deux fronts de nanoparticules ou de la photoporation en flux sans séparation (fig.5.3), l'approche avec séparateur n'impacte pas la croissance des cellules. Toute chose égale par ailleurs, la différence est une conséquence du nombre de nanoparticules et donc de nanopores créés.

Il existe une corrélation entre perméabilisation et viabilité pour les petites distances. Pour les distances ~ 0 et ~ 6 µm, la forte mortalité des cellules explique directement la faible fraction positive qui intègre cette dernière puisque mesuré à $J+1$. L'amélioration de la mortalité pour la distance ~ 12 µm ne s'accompagne pas de l'augmentation du taux de croissance parce que les perturbations sont présentes pour $d_{\text{Cell-AuNP}} \in [0, 24]$ µm et modifient la position des cellules potentiellement dans toutes les directions, en admettant qu'il s'agit d'ondes générées par le laser se propageant sphériquement. La combinaison des effets plasmoniques et des perturbations parasites génèrent des contraintes mécaniques importantes subies par les cellules en flux.

La forte mortalité de cellules à petites distance, déjà observée pour le cas de la photoporation en flux (sans séparation), va à l'encontre de ce qui a été obtenu en photoporation de cellules adhérentes, où les nanoparticules sont au contact des membranes cellules ($d_{\text{Cell-AuNP}} = 0$ µm) et irradiées dans les mêmes conditions optiques (résultats du chapitre 2). D'une part la configuration fluidique introduit de nouvelles contraintes de cisaillement auxquelles s'ajoutent les effets de cavitation [233]. D'autre part, la visco-élasticité du milieu dans lequel les nano-bulles de vapeur sont générées contraint leur taille. Elles sont donc plus petites et leur énergie plus faible (elle dépend du rayon) : l'effet de perméabilisation est réduit et l'impact sur la viabilité moindre [80, 234, 235].

En séparant cellules et nanoparticules, la dynamique de cavitation des nano-bulles de vapeur est différente et l'effet sur les cellules va dépendre de plusieurs paramètres comme le rayon de la bulle, la distance par rapport à la cellule et la position de celle-ci (adhérente ou en suspension). Dans le cas de la photoporation directe par exemple, les bulles de vapeur générées par rupture de diélectrique dans un milieux aqueux sont quasi millimétriques, avec des rayons pouvant atteindre $\sim 100 - 1000$ µm pendant l'expansion [80, 159]. Cette étape de la cavitation applique des efforts de cisaillement au voisinage de la bulle par le mouvement du fluide entraîné. Si le traitement se fait sur des cellules adhérentes, ces dernières se trouvent dans la couche limite où le cisaillement est d'autant plus important [77]. Une bulle, générée par un laser nanoseconde de longueur d'onde 532 nm focalisé 10 µm au dessus de la couche de cellules, s'étend pour atteindre un rayon de ~ 200 µm et génère pendant son expansion des zones de lyse (décollement de cellule et destruction de la membrane) de 20 à ~ 60 µm [77]. Une approche similaire exploite la génération d'une bulle de vapeur de rayon $\leqslant 60$ µm pour la perméabilisation de cellules adhérentes. Trois gammes de distance sont obtenues. La lyse de cellule se produit pour des distances $\leqslant 50$ µm. La nécrose se présente pour des cellules à $\geqslant 30$ µm et $\leqslant 150$ µm du site de création de la bulle. Enfin, les distances $\leqslant 250$ µm et $\geqslant 60$ µm accueillent une perméabilisation et une meilleure viabilité [160].

L'utilisation des intermédiaires plasmoniques dans les gammes de fluences adéquates permet l'obtention de bulles de vapeur nano/micro-métriques. La photoporation de cellules adhérentes par l'intermédiaire de nanoparticules fixées par une pince optique donne un optimum de perméabilisation entre 10 et 50 µm [83]. En augmentant la taille des nanoparticules, le rayon des nano-bulles générées augmente. Le cisaillement créé pendant l'expansion de la bulle a alors un rayon d'action ≈ 5 fois plus important. La zone de faible viabilité (nécrose) fait dans ce cas 30 µm de rayon au lieu de 5 et la zone de perméabilisation s'étend sur 70 µm au lieu d'un optimum $\geqslant 10$ µm [111, 236]. Ces études indiquent qu'après la phase d'expansion de la bulles (micro ou millimétrique), les cellules subissent des dommages. Dans le cas de leur lyse et donc leur décollement, les phénomènes ultérieurs liés à la cavitation ne sont plus caractérisables par la viabilité des cellules.

De ce fait, l'effet de l'expansion de la bulle sur la viabilité n'exclut pas celui d'un jet généré lors de la phase de l'effondrement de la nano-bulle de vapeur [77]. À proximité d'une paroi, il y a une rupture de symétrie sphérique pendant la phase d'effondrement de la bulle et il se forme ainsi un jet de fluide [159, 237]. Selon l'élasticité de la

paroi (module d'Young) et la distance entre cette dernière et le site de nucléation de la bulle, la direction et la vitesse du jet varie [227, 228, 238]. La vitesse du jet dépend également du rayon maximal de la bulle en phase d'expansion. Il intervient par ailleurs dans la force du jet avec le diamètre de ce dernier, valant à peu près un dixième du diamètre de la bulle [239].

Dans un protocole de perméabilisation acoustique (sonoporation), l'émission du jet à l'effondrement de la bulle de cavitation peut induire deux effets. Un flux radial est créé au point de projection du jet sur la surface où se trouvent les cellules adhérentes. Il crée alors un cisaillement plus important que celui observé pendant l'expansion de la bulle. La zone d'endommagement des cellules peut s'étendre à ~ 200 µm pour une bulle de rayon maximal $R_{\max} \sim 300$ µm [178, 178]. Au point d'impact du jet sur la paroi (une membrane cellulaire par exemple), il y a un point de stagnation défini par une vitesse nulle. Au voisinage de ce point, les contraintes divergent [239]. Toutefois, il est possible de définir la pression en ce point où se produit un transfert de moment grâce au mouvement du fluide qui équivaut ~ 15 kPa [106, 235]. Toujours dans cette phase d'effondrement, la création de jet et la variation soudaine de vitesse de liquide peut engendrer un phénomène hydraulique de surpression (coup de bélier) qui est estimé à 4 MPa [106]. Selon son diamètre, le jet agit potentiellement comme un impact au niveau de la membrane qui la perméabilise localement [235, 238, 240].

La photoporation à distance, présentée ici, montre l'existence d'un optimum entre viabilité et perméabilisation à $d_{\text{Cell-AuNP}} = 18$ µm. Cette valeur est faible devant les distances de perméabilisation de la littérature obtenues par sonoporation ou photoporation directe (~ 100 µm) [160]. Cela peut s'expliquer par le rayon plus petit des bulles de vapeur générées dont dépendent les contraintes générées (cisaillement, jet...). Dans les conditions testées, les nano-bulles de vapeur ont un rayon initial entre 0.1 à 0.7 µm et une durée de vie $\leqslant 100$ ns [71, 81, 82]. La distance obtenue est légèrement supérieure à ce qui est disponible dans la littérature mais reste comparable (~ 10 µm) [83]. De façon intéressante, la mise en suspension, contrairement au traitement de cellules adhérentes de ce dernier exemple, ne réduit pas la distance car les contraintes de cisaillement sont moins importantes. Quand bien même la taille des nano-bulles de vapeur est comparable, les lignées cellulaires sont différentes et l'effet à ~ 20 µm n'est pas rapporté dans la littérature.

Mise à part la méthode de génération de bulles en cavitation, l'approche de la photoporation à distance est réalisée à l'intérieur d'une puce microfluidique, un environnement en flux, confiné et délimité. Dans le cas de la photoporation directe par exemple, pour une lignée cellulaire donnée, le traitement en boîte de culture (rayon de la nano-bulle non précisé) renvoie un optimum autour de 50 µm pour la viabilité et l'efficacité de perméabilisation [241]. Dans cette étude, la distance est variée par intervalle de 10 µm entre 0–10 et 61–70 µm. Transposée à la microfluidique, la même approche avec la même lignée cellulaire adhérente cultivée en puce permet la perméabilisation membranaire sur des distances environ 4× plus grandes (~ 200 µm). Le confinement de la génération de nano-bulles peut augmenter la portée des effets acoustiques puisque les parois réfléchissent les ondes émises [242].

Considérant le confinement en puce microfluidique et la mise en suspension des cellules, la portée de l'effet de perméabilisation de la photoporation reste cohérente avec ce qui a déjà été rapporté. En deçà de l'optimum (~ 20 µm), les contraintes mécaniques sont trop importantes pour réaliser une perméabilisation viable des cellules. En augmentant la distance, les contraintes diminuent pour atteindre une valeur pour laquelle la survie cellulaire atteint un maximum. La perméabilisation reste alors effective. Au delà d'une certaine valeur, les contraintes sont suffisamment faibles pour ne plus impacter les membranes cellulaires, aboutissant à une fraction positive comparable aux contrôles.

Les conditions de générations de nano-bulles de vapeur varient entre les différentes approches de photoporation de cellules, adhérentes ou en suspension, mises au point jusque là. Les petites distances étudiées dans cette section (fig. 5.4) sont similaires – ou du moins du même ordre de grandeur – à celles réalisées pendant la photoporation en flux ou en gaine de nanoparticules (chapitre 2 et fig. 5.3), particulièrement pour la distance nulle qui révèle également une perturbation de l'écoulement. Cependant, la fraction positive n'est pas comparable. Le rayon initial des nano-bulles, et par conséquent leur dynamique de cavitation, va dépendre de la fluence d'excitation par rapport à la fluence seuil de chauffe de la nanoparticule d'or jusqu'à la température d'ébullition du milieu [82, 229].

Le faisceau est ici centré sur leur flux porteur et non plus sur le flux porteur de cellules dans le cas de la gaine de nanoparticules. La fluence avec laquelle sont irradiées les nanoparticules en séparation ($\approx I_{\max}$) implique la formation de nano-bulles de vapeur de rayons plus importants qui nuisent plus à la viabilité. Par ailleurs, la présence de deux fronts de génération de nano-bulles dans le cas de la gaine de nanoparticules compense les perturbations de l'écoulement cellulaire : malgré les déviations, les cellules ne sont pas hors de portée des phénomènes acoustiques, ce qui n'est pas le cas pour la photoporation avec séparation. Ces deux éléments sont cohérents avec la chute de la fraction positive entre les deux approches à distance nulle.

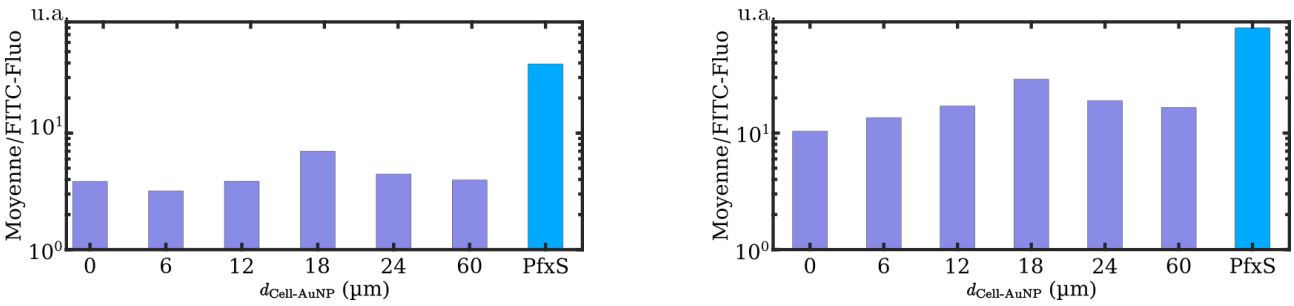
Deux gammes de distances sont définies avec les fracitons positives et les taux de viabilité autour de la distance critique $d_{\text{Cell-AuNP}} \sim 18$ µm. Il existe une portée spatiale à la perméabilisation par nano-bulles de vapeur dans un environnement microfluidique. Avec des valeurs similaires à la littérature, l'amplification des effets (réflexions des ondes) par rapport à des conditions "statiques" a alors également une portée limitée [83]. Par ailleurs, la corrélation entre les deux gammes de distance et la fraction positive peut s'expliquer. Ce dernier est faible dans la gamme présentant une viabilité plus faible et un flux perturbé. Les contraintes mécaniques issues de la génération de nano-bulles de vapeur en cavitation et l'accumulation avec les perturbations de l'écoulement sont élevées. La perméabilisation est réalisée avec une forte mortalité ce qui conduit à une fraction positive basse, comparable à la fraction obtenue par la contribution fluidique. En d'autres termes, les cellules photoporées pendant l'écoulement à petites distances ne survivent pas contrairement à celles perméabilisées fluidiquement.

La valeur de 18 µm marque la transition vers des contraintes mécaniques pour perméabiliser de manière viable la membrane cellulaire sans perturber l'écoulement cellulaire. L'absence de valeurs intermédiaires de la fraction positive comme celles obtenues pour le taux de viabilité pour $d_{\text{Cell-AuNP}} \sim 18$ µm (fig. 5.4) est contre-intuitive. Une unique valeur ressort du niveau basal de la fraction positive pour des phénomènes graduelles (décroissance des contraintes avec la distances) [236, 241]. Les membranes cellulaires, visco-élastiques, ont des seuils de déformations délimitant les régimes élastiques et de rupture. L'existence de ce seuil de contraintes mécaniques permettant la perméabilisation de la membrane cellulaire de façon viable explique l'absence de perméabilisation significative au-delà de la distance critique [107, 223, 243]. Pour les valeurs de distances plus petites où la perméabilisation existe mais est peu viable, une explication est que l'optimum est réellement à une valeur inférieure (entre 6–18 µm). Or les perturbations sont encore effectives dans cette zone ce qui limite la performance de la photoporation en éjectant les cellules hors de la portée des contraintes mécaniques viables (fig. 5.4b).

Les contraintes mécaniques créées par irradiation des nanoparticules sont effectives sur un rayon de ~ 20 µm pour la perméabilisation. donc, plus les cellules sont proches du front de nanoparticules irradiées, plus les contraintes mécaniques augmentent et ainsi la taille des nanopores créés dans les membranes. Si la viabilité est compromise, les cellules survivantes incorporent du FITC-Dextran *via* grâce à cette perméabilisation. L'efficacité d'incorporation, mesurée par le biais de la fluorescence intracellulaire, dépend des tailles de pores et donc

de la variation des contraintes mécaniques. L'efficacité d'incorporation doit donc décroître si les cellules étudiées sont uniquement celles fluorescentes [85, 107].

3.2.2 Efficacité d'incorporation et fluorescence intracellulaire



(a) Efficacité d'incorporation en fonction de la distance

(b) Incorporation sur la population fluorescente

FIGURE 5.5 – **Efficacité d'incorporation de la photoporation en flux à distance comparé à la photoporation en flux (PfxS).**
Mesure de la fluorescence intracellulaire obtenue par perméabilisation en flux : à distance et en flux (sans séparation). **Fig.a)** Efficacité d'incorporation obtenue par la mesure de la fluorescence intracellulaire sur toute la population de cellules. Cette grandeur suit la même tendance que la fraction positive en passant par un maximum de ~ 7 u.a. pour la valeur $d_{\text{Cell-AuNP}} \sim 18$ µm. La distance $d_{\text{Cell-AuNP}} \sim 0$ µm a une efficacité d'incorporation légèrement supérieure à $d_{\text{Cell-AuNP}} \sim 6$ µm, probablement à cause des incertitude de mesures. Par ailleurs, la quantité de FITC-Dextran incorporé par photoporation à distance reste très faible en comparaison avec celle obtenue par photoporation en flux sans séparation (~ 40 u.a.). **Fig.b)** Efficacité d'incorporation obtenue par la mesure de la fluorescence intracellulaire sur la population de cellules fluorescentes détectées. L'efficacité d'incorporation croît jusqu'à son maximum à la distance optimale $d_{\text{Cell-AuNP}} \sim 18$ µm et décroît ensuite pour les points plus éloignés. L'écart entre l'optimum de photoporation à distance et la photoporation en flux reste important mais passe d'un facteur ~ 5.7 à un facteur ~ 2.6 pour la population fluorescente (30 comparé à 80 u.a.).

L'efficacité d'incorporation est décrite par la fluorescence intracellulaire moyenne et donc la quantité incorporée de FITC-dextran. Dans un premier temps, cette grandeur, mesurée sur toute la population par échantillon, suit la même tendance que la fraction positive en passant par un maximum de ~ 7 u.a. pour la valeur $d_{\text{Cell-AuNP}} \sim 18$ µm (fig.5.5a). La distance $d_{\text{Cell-AuNP}} \sim 0$ µm a une efficacité d'incorporation légèrement supérieure à $d_{\text{Cell-AuNP}} \sim 6$ µm, probablement à cause des incertitudes de mesures. Par ailleurs, la quantité de FITC-Dextran incorporé par photoporation à distance reste très faible en comparaison avec celle obtenue par photoporation en flux sans séparation (~ 40 u.a. mesurée sur tout l'échantillon). Dans un deuxième temps, la mesure est restreinte aux cellules exprimant la fluorescence en effectuant un seuillage avant la mesure du signal intracellulaire. L'efficacité d'incorporation croît jusque son maximum à la distance optimale $d_{\text{Cell-AuNP}} \sim 18$ µm et décroît ensuite pour les points plus éloignés (fig.5.5b). L'écart entre l'optimum de photoporation à distance et la photoporation en flux reste important mais passe d'un facteur ~ 5.7 à un facteur ~ 2.6 pour la population fluorescente (30 comparé à 80 u.a.).

Les perturbations de l'écoulement pendant la photoporation en flux sans séparation s'appliquent aux systèmes cellule-nanoparticules contrairement à la photoporation à petites distances où les cellules sont éjectées de leurs trajectoires hors de la portées de nano-bulles de vapeur. Avec des fractions positives importantes et une efficacité d'incorporation comparable aux résultats obtenus en photoporation de cellules adhérentes, la disposition des nanoparticules par rapport aux cellules n'est pas drastiquement modifiée. Une fraction des intermédiaires plasmoniques en suspension restent donc dans la couche limite du fluide au voisinage des cellules, adhérées ou dissociées des membranes. Dans ces conditions, la distance séparant le centre de la nano-bulle générée – en l'occurrence la

nanoparticules d'or – et la membrane est de l'ordre du rayon maximale de la bulle ($\gamma = d_{\text{Cell-AuNP}}/R_{\max} \sim 1$). Avec une paroi élastique (de module d'Young $E \sim 100$ kPa [244]) comme une membrane cellulaire rompant la symétrie de la cavitation, des jets de fluide sont émis à l'opposé et en direction de la paroi avec des vitesses, selon le rayon de la bulle, pouvant atteindre ~ 100 m/s [228, 238].

La distance optimale de perméabilisation en flux avec séparation de $\sim$ 20 µm est comparable à ce qui a été rapporté dans la littérature dans le cas de la perméabilisation par nano-jet. Cette valeur a été obtenu par génération d'une bulle de vapeur directement par laser dans une puce microfluidique au voisinage d'une cellule en suspension immobilisée [107]. Dans ce cas particulier, la bulle de vapeur générée est de rayon $\sim$ 42 µm à des distances entre 15 et 30 µm ($\gamma \in [0.36, 0.71]$). Or, les bulles générées par intermédiaire plasmonique sont de rayon de deux ordres de grandeur plus petit. Le phénomène se produit également pour des bulles de plus petites tailles générées optiquement mais reste atténué par la tension de surface [161].

De plus, la couche de liquide séparant la bulle pendant son effondrement et la paroi ciblée ralentit le jet. Pour les valeurs de γ données ci-dessus, il a une vitesse de maximum 1 m/s (la vitesse du jet est linéaire avec le rayon maximal de la bulle, pour $R_{\max} \sim 1$ mm par exemple, la vitesse du jet atteint 500-800 m/s) [228, 239, 245]. La pression appliquée dépend de la vitesse du jet dans la zone d'impact qui reste très localisée (diamètre du jet), d'où la meilleure survie des cellules traitées en photoporation en flux sans séparation par rapport aux petites distances (fig. 5.4) [235].

Dans la configuration avec séparateur, pour la distance critique en particulier, le paramètre γ est de l'ordre de la dizaine. La vitesse du jet est alors beaucoup moins importante. L'effet des "nano-jets" est donc négligeable. La génération de jet pendant l'effondrement de la bulle est donc plus pertinente dans le cas de la photoporation en flux sans séparation puisque les nanoparticules sont au voisinage de la cellule.

Les échantillons, issus de la photoporation avec séparation ou de la photoporation en flux sans séparation, exploitent des conditions très différentes d'excitation de nanoparticules. La photoporation en flux, telle qu'elle est mise en oeuvre, consiste à irradier une suspension de cellules et de nanoparticules réparties de façon uniforme autour des membranes cellulaires. Les nanoparticules se situant entre le côté d'entrée du laser et la cellules sont les plus susceptibles de générer des nanopores. La photoporation avec séparation exploite l'excitation d'une densité de nanoparticules occupant toute l'épaisseur du canal. Les interactions entre nanoparticules et nano-bulles ne sont alors plus négligeables [190, 246].

La distance $d_{\text{Cell-AuNP}} \sim 0$ µm permet de diminuer le paramètre γ à des valeurs correspondant à la génération de nano-jets orientés vers la membrane entraînant sa perméabilisation. Cependant, une couche de liquide persiste entre nanoparticules et membrane qui peut réduire l'effet mécanique du nano-jet [105, 238]. De plus, les perturbations observées ont des vitesses de propagation comparables à la célérité du son dans l'eau, plus élevées que la vitesse des nano-jets potentiellement créés. Tous ces éléments ne favorisent pas la perméabilisation par nano-jet en particulier pour la distance optimale (18 µm).

Les trois distances inférieures à l'optimum ne réalisent pas de perméabilisation significative à cause des perturbations et la chute de viabilité. Dans cette hypothèse, ne survivent que les cellules ayant été perméabilisées passivement par la contribution fluidique. L'efficacité d'incorporation n'étant pas identique entre les distances 0, 6 et 12 µm (fig. 5.5b), les contraintes cumulées diminue avec la distance. En effet, l'amélioration de la viabilité avec la persistance des perturbations pour la distance $d_{\text{Cell-AuNP}} \sim 12$ µm indique que l'accumulation de

la contribution de nanoparticules excitées, des perturbations et de leurs réflexions – donc deux fronts d'onde consécutifs – conduit à des déformations de membranes cellulaires importantes. L'éloignement les diminue en deçà du seuil critique pour la viabilité des cellules [237, 242]. Puisque les impédances sont différentes entre paroi et liquide en écoulement, les réflexions acoustiques ont nécessairement une intensité moindre et s'atténuent donc plus rapidement avec la distance. On peut supposer que les ondes émises par les nanoparticules irradiées sont plus intenses que celles des perturbations puisque la fraction positive et l'efficacité d'incorporation sont supérieures pour $d_{\text{Cell-AuNP}} \sim 18$ µm en comparaison avec les distances plus petites.

Une autre remarque similaire concerne la corrélation entre l'efficacité d'incorporation et la distance. En effet, l'exemple de la photoporation en flux sans séparation montre que cette grandeur peut être maximale en la limitant à la population de cellules exprimant de la fluorescence quand bien même la viabilité est impactée. En effet, se limiter aux cellules survivantes permet de caractériser la perméabilisation. Pour des contraintes décroissantes, l'efficacité d'incorporation du FITC-Dextran doit être maximale pour $d_{\text{Cell-AuNP}} \sim 0$ µm et décroître. Une autre possibilité est que cette grandeur soit maximale pour les premières valeurs auxquelles les fractions positives et de viabilité commencent à s'améliorer, comme ce qui est observé dans le cas d'une photoporation directe sur cellules adhérentes [241]. Contrairement à ce dernier exemple, la viabilité obtenue (fig.5.4e et f) n'est pas nulle pour les petites distances. Cela est notamment dû à la non adhésion des cellules en flux. Ce degré de liberté permet la "dissipation" d'énergie acoustique en énergie cinétique malgré une amplification due au confinement en puce.

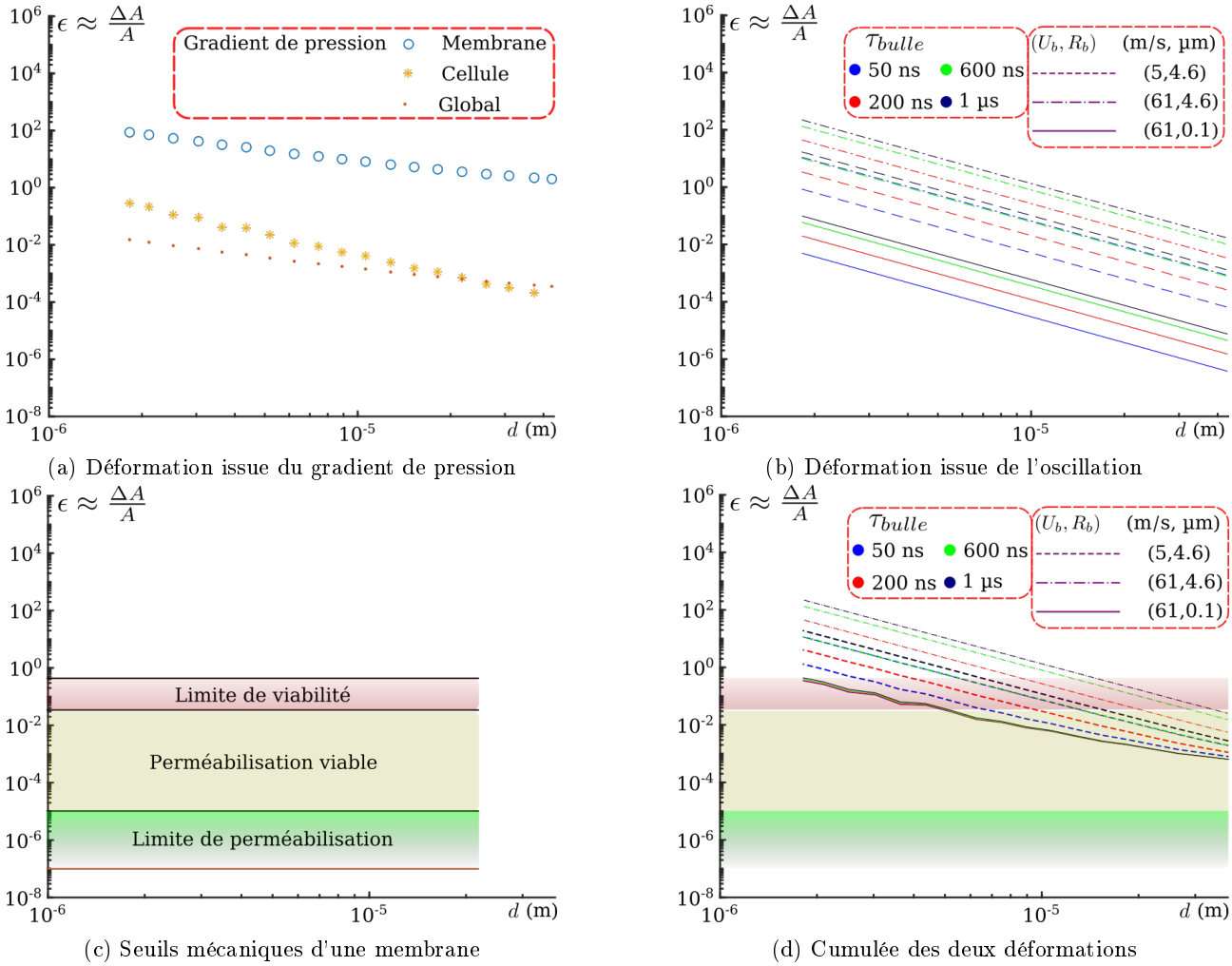
Les contraintes en jeu sont de différents types pendant le phénomène de cavitation. Les membranes sont soumises à l'oscillation volumique de la bulle (pendant l'expansion ou l'effondrement) qui crée des mouvement de fluide. Pendant l'effondrement, en supposant l'absence de nano-jets pour les valeurs de γ aux distances non-nulles, une onde de compression est émise de manière sphérique. Les pores créés de diamètre 1-10 nm sont réparables alors que pour des tailles supérieures ($\sim$ 100 nm), il y a rupture de la membrane [104]. Mécaniquement, pour des contraintes (en cisaillement) par exemple, les cellules subissent une lyse et une nécrose pour des valeurs supérieures à 18 kPa. La création de pores viable se fait pour entre 8 et 18 kPa. En compression, les valeurs seuils sont plus élevées (de l'ordre de 0.1 MPa pour la lyse par exemple) parce que les cellules sont plus sensibles en traction [77, 160]. Si l'on considère la génération de nano-jet pendant la photoporation en flux sans séparation, malgré le taux de viabilité bas, les cellules subissent des contraintes de l'ordre de $\sim$ 15 kPa [105, 106]. Les valeurs critiques de contraintes auxquelles les cellules sont soumises varient avec les lignées cellulaires. Une valeur courante dans la littérature est 3 kPa [82].

Une autre manière de décrire la perméabilisation est de considérer la déformation plutôt que la contrainte. En considérant une variation de la surface membranaire, le seuil de déformation critique $\epsilon_c = \Delta A/A$ est évalué à $\sim 3\%$ (fig.5.6c) [104, 106, 235, 247, 248]. D'autres études aboutissent à des valeurs supérieures ($6 - 10\%$ et 40%) en considérant par exemple la durée d'application de la contrainte et son caractère impulsionnel [223, 224]. Les deux phases de cavitation retenues sont donc les oscillations de la bulle et l'onde de pression émise à l'effondrement. Les déformations qui en résultent peuvent être définies par [104, 247, 248] :

$$\frac{\Delta A}{A} = \frac{U_b R_b^2}{r^3} \tau_{\text{bulle}} \tag{1}$$

$$R_b = \frac{\Delta t}{2 \cdot 0.915} \sqrt{\frac{p_0}{\rho}} \tag{2}$$

$$\frac{\Delta A}{A} = \left(\frac{\Delta P}{\Delta r}\right) \frac{\Delta \tau_{\text{onde}}}{\rho c} \tag{3}$$



(a) Déformation issue du gradient de pression

(b) Déformation issue de l'oscillation

(c) Seuils mécaniques d'une membrane

(d) Cumulée des deux déformations

FIGURE 5.6 – **Déformations de surface générées par les contraintes mécaniques de nano-bulles de la photoporation.**
Déformations de surface relative engendrées par les nano-bulles de vapeur (oscillation, effondrement) suivant les équations (1) et (3) page 141 en fonction de la distance $d_{\text{Cell-AuNP}}$. Tous les graphiques prennent la distance $d_{\text{Cell-AuNP}}$ en micromètre en abscisse et la déformation relative en ordonnées. **Fig.a)** Déformation en surface de la membrane issues du gradient de pression de l'onde émise à l'effondrement de la nano-bulle. Le gradient est calculé pour différentes longueurs caractéristiques : l'épaisseur de la membrane, la taille de la cellule et le gradient à l'échelle de la distance (gradient global). Les valeurs élevées et basses des gradient calculés à l'échelle de la membrane et de la distance respectivement ne sont pas cohérentes avec les observations expérimentales. La déformation issue du gradient à l'échelle de la cellule renvoie une distance correspondant à sa valeur critique de 3% égale à $\sim 4-5$ µm. **Fig.b)** Déformation en surface de la membrane cellulaire issue de l'oscillation selon l'équation 1 page 141 en fonction de la distance entre cellules et position de la bulle ($d_{\text{Cell-AuNP}}$). Les courbes sont données pour différentes valeurs de vitesse d'oscillation avec différentes durées de vie de la bulle. Les couples (U_b, R_b) correspondent aux valeurs de vitesse et de rayon à différents stade de la dynamique de la bulle (expansion et effondrement). La distance à partir de laquelle la déformation est inférieure à 3% se situe entre 15-20 µm pour des temps d'exposition de l'ordre de la microseconde pour $(U_b, R_b) \sim (5$ m/s, 4.6 µm (début de l'effondrement). Pour des temps d'exposition de l'ordre de 100 ns, la distance est plus petite (2 µm). **Fig.c)** Seuil mécanique de déformation de la membrane des cellules entre seuil d'endommagement irréversible et seuil de perméabilisation. **Fig.d)** Déformation cumulée de la contribution de l'oscillation de la nano-bulle et du gradient à l'échelle de la cellule de l'onde de pression émise à l'effondrement. Le cumul des deux contraintes renvoie une distance critique de l'ordre de 30 µm.

La déformation issue des oscillations volumiques (équation 1) se calcule avec les valeurs de vitesse de battement de la bulle U_b, son rayon R_b ainsi que le temps caractéristiques d'exposition de la cellule à la bulle et sa dynamique. Dans notre étude, on peut estimer que la cellule est exposée pendant la durée de vie d'une bulle

$\tau_{\text{bulle}} \sim 110$ ns. Dans les conditions de générations plasmoniques, la vitesse d'oscillation pour une bulles de rayon allant de 100 nm à 3 µm en l'espace de ~ 110 ns varie entre 61 m/s au début de l'expansion et 5 m/s pendant la phase d'effondrement [111].

La cellule, dont le temps de parcours dans la zone d'irradiation est de ~ 300 ms, est exposée pendant $\tau_{\text{bulle}} \sim 110$ ns [71, 81, 111]. La correspondance entre le rayon maximal de la bulle R_b et sa durée de vie $\Delta t = \tau_{\text{bulle}}$ est donnée par l'équation 2 de Rayleigh [81, 249]. p_0 et ρ sont respectivement la pression atmosphérique et la densité du milieu liquide. Cette relation donne des valeurs de rayon sous-évaluées probablement à cause de la non prise en compte de la tension de surface à ces échelles de rayon [81, 161].

Parallèlement, la déformation créée par l'onde de pression émise à l'effondrement (équation 3) dépend du gradient spatial de pression, de la largeur temporelle de l'onde τ_{onde}, de la densité du milieu ρ et la célérité du son c dans milieu. Dans le cas d'une nano-bulle de vapeur générée par une nanoparticule de 80 nm de diamètre dans des conditions d'excitation comparables, l'onde a une durée $\tau_{\text{onde}} \sim 30$ ns [82]. La définition du gradient peut se faire à différentes échelles (fig.5.6a). On peut considérer l'atténuation de l'onde entre émission et arrivée à la cellule (gradient global). Le gradient spatiale de l'onde de pression entraîne alors des déformations relatives de l'ordre de $0.1-1\%$. De manière plus localisée, on peut considérer les variations au niveau de la membrane cellulaire. Avec une épaisseur de l'ordre de ~ 5 nm, les déformations engendrées sont très grandes ($\gg 100\%$) [250]. Cela implique une mort cellulaire systématique sur des distances de l'ordre de ~ 100 µm, ce qui n'est pas observé expérimentalement. Le choix du gradient à l'échelle de la cellule (de taille caractéristique 30 µm) semble aboutir à des déformations plus cohérentes et réalistes avec ce que renvoie l'étude de viabilité de la photoporation (fig.5.4).

Les équations 1 et 3 page 141 sont appliquées à une source unique en considérant que la perméabilisation est localisée. Autrement dit, les valeurs calculées ne donnent qu'une borne inférieure. Les déformations issues de l'oscillation de la nano-bulle ou de l'onde de pression émise à l'effondrement de cette dernière sont calculées en fonction de la distance entre le centre de la bulle et la membrane cellulaire (fig. 5.6a et b). La déformation ainsi estimée est à comparer aux différentes valeurs critiques présentes dans la littérature par rapport à la viabilité et la perméabilisation de membrane (fig.5.6c).

L'équation 3 permet d'estimer la contraintes reçue par la membrane cellulaire à l'arrivée de l'onde de pression émise à l'effondrement de la nano-bulle de vapeur (fig. 5.6a). La considération du gradient global, renvoie des déformations inférieures à 2% à partir d'une distance de 1 µm. On peut donc négliger sa contribution. En considérant le gradient à l'échelle de la cellule, la déformation superficielle relative de la membrane donne une distance correspondant à sa valeur critique de 3% égale à $\sim 4-5$ µm. Cependant, la viabilité ne s'améliore qu'à partir de la distance de ~ 12 µm. Toujours dans l'hypothèse d'une source acoustique unique, on peut introduire un deuxième phénomène estimé par l'équation 1.

La seule oscillation de la nano-bulle peut entraîner des déformations de l'ordre de 3% pour des distances allant jusque 40 µm selon les paramètres de la nano-bulle de vapeur (fig.5.6b). Au début de la phase d'expansion (pour $(U_b, R_b) \sim (61 \text{ m/s}, 0.1 \text{ µm})$), les contraintes sont dans la gamme de perméabilisation dès les premiers micromètres de distance, quel que soit le temps d'exposition (durée de vie de la bulle). Durant la phase d'effondrement $(U_b, R_b) \sim (5 \text{ m/s}, 4.6 \text{ µm})$, la déformation atteint le seuil critique de 3% selon la durée d'exposition entre ~ 5 et ~ 15 µm. Le seuil critique de 40% est naturellement atteint pour des distances inférieures à 5 µm où la viabilité est basse dans les conditions de photoporation. En considérant une bulle microscopique avec une vitesse d'oscillation élevée $(U_b, R_b) \sim (61 \text{ m/s}, 4.6 \text{ µm})$, les distances de déformations critiques deviennent

comparables aux distances critiques obtenues expérimentalement. Cependant, les vitesses sont maximales au début de l'expansion. Des valeurs similaires impliquent donc des générations de bulles microscopiques qui ne sont pas compatibles avec les paramètres optiques et plasmoniques de nos études.

Le cumul des contributions de gradient et d'oscillation est considéré dans l'hypothèse où les contraintes se font dans des temps très court devant l'élasticité de la membrane ($\sim$ s) [251]. Il est également possible de considérer, dans le cas où les temps de réponses de la membranes sont du même ordre de grandeur que l'exposition à la nano-bulles ($\sim$ µs), la sollicitation par une séquence de contraintes entraîne des endommagements et des déformations à des seuils moins importants [176]. Dans les deux cas et en première approximation, on considère que la déformation globale est l'addition des deux contributions d'oscillation et d'onde de pression (fig.5.6d).

Le seuil critique de 3% est atteint dans le cas où l'onde de pression est conjuguée au mouvement de la bulle au début de l'effondrement. La durée d'exposition la plus cohérente avec la distance critique obtenue lors de la photoporation est de l'ordre de la microseconde, soit un rayon maximal de bulle de l'ordre de 5 µs. Dans le cas où les temps d'exposition sont de l'ordre de $50 - 200$ ns, la distance à partir de laquelle la déformation est inférieure à 3% se situe entre 7-10 µm, comparable à la distance $d_{\text{Cell-AuNP}} \sim 12$ µm pour laquelle la viabilité et l'efficacité d'incorporation s'améliorent de façon significative.

Les valeurs de distances obtenues par les équations dans le cas du seuil critique choisi de 3% sont compatibles avec l'observation expérimentale. En effet, le seuil de 3% de déformation surfacique critique semble correspondre à la lignée de HeLa en suspension en écoulement microfluidique alors que les valeurs correspondant au seuil de 40% couvrent des distances plus petites où les perturbations ne permettent pas la mesure. Dans l'hypothèse où l'on néglige les perturbations et que la seule contribution est issue des oscillation de la bulle, la durée de vie de la bulle – en la considérant égale à la durée d'exposition de la cellule aux contraintes – est de l'ordre de 1 µs. Pour les contraintes cumulées, la durée de vie est alors estimée à $\sim 200 - 600$ ns, cohérente avec les valeurs de la littérature [81].

Compte tenu de l'efficacité d'incorporation mesurée pour les échantillons traités par photoporation en flux sans séparation et les échantillons photoporés avec séparateur, on conclut que la contribution des nano-jets à la perméabilisation est négligeable dans le deuxième cas (fig.5.5b). De plus, en considérant le seuil critique de déformation de 3%, il s'avère que la création de nanopores aux distances non nulles est vraisemblablement due aux mouvements du fluide autour de la nano-bulle en cavitation et à l'onde de pression émise à l'effondrement.

Malgré la réduction du séparateur pour minimiser la distance entre cellule et nanoparticules pendant l'irradiation, la photoporation à distance ne semble pas concernée par la génération de nano-jets. D'une part, les conditions avec les petites distances ($d_{\text{Cell-AuNP}} \leqslant 12$ µm) sont perturbées et ne réalisent pas de perméabilisation significative pour caractériser la fluorescence intracellulaire. D'autre part, la durée de vie estimée de ~ 200 ns correspond, avec l'équation 2, à un rayon de ~ 1 µm. Le paramètre de distance de séparation γ permettant la génération de nano-jets impose que $d_{\text{Cell-AuNP}} \leqslant 2$ µm.

La stabilisation de l'écoulement pendant l'irradiation avec le laser de photoporation est par conséquent nécessaire pour exploiter la génération de nano-jets dans la perméabilisation des membranes cellulaires. Les perturbations sont issues de l'apport d'énergie optique au voisinage des parois en verre. Une première méthode revient à augmenter la profondeur du canal pour éloigner ces effets de bords de l'écoulement focalisé des cellules. Un deuxième moyen est la réduction de la fluence pour s'éloigner du seuil énergétique d'interaction entre les

impulsions laser et le substrat en verre. Cette approche peut être au dépend de la génération de nano-bulles. Il est donc nécessaire de réduire la distribution spatiale des nanoparticules pour éviter les effets d'interaction et d'écrantage entre nanoparticules et nano-bulles. L'introduction d'une focalisation verticale, en plus de la focalisation horizontale déjà existante, est un moyen de réaliser ces deux méthodes pour améliorer la stabilité de l'écoulement. La réduction du nombre d'impulsions laser et par conséquent de la vitesse d'écoulement peut aussi aider à améliorer la stabilité.

Il reste que l'approche microfluidique introduisant un flux séparateur entre cellules et front de nanoparticules réalise une fraction positive inférieure à celui obtenu avec les deux phases séparées *via* la photoporation avec gaine de nanoparticules. La disposition des nanoparticules par rapport au laser d'excitation étant différentes, les caractéristiques des nano-bulles générées sont modifiées et conduisent donc à une perméabilisation et une incorporation du FITC-Dextran différentes.

3.3 Taux de perméabilisation : gaine de nanoparticules et liquide séparateur

Trois approches sont retenues de celles présentées antérieurement. La photoporation en flux sans séparation se démarque avec des fractions positives importantes (selon la concentration de nanoparticules utilisée, entre 40 et 70%) et des sites de création de nano-bulles de vapeur optimisés (~ 100 nanoparticules autour des cellules), une irradiation avec une fluence $I \leqslant I_{\max} \approx 2.6 - 2.9$ J/cm^2 et les bonnes conditions pour la générations de nano-jets. Quand bien même elle réalise les meilleures fractions positives et efficacités d'incorporation, cette approche nécessite une étape supplémentaire ultérieure à l'irradiation pour séparer cellules et nanoparticules.

La deuxième approche est la photoporation en séparation avec une gaine de nanoparticules qui conduit à une fraction positive autour de $\sim 30\%$. À cause de la position du faisceau laser dans la zone de l'irradiation dans la puce microfluidique, les nanoparticules se trouvent à $\approx 25 - 30$ µm du maximum d'intensité du faisceau laser et à $d_{\text{Cell-AuNP}} \approx 0$ µm des cellules. Elles sont ainsi excitées à moindre fluence $I_- \approx 2.2 - 2.5$ J/cm^2. Enfin, la photoporation à distance avec séparateur aboutit à $\sim 20\%$ de cellules perméabilisées à l'optimum et les nanoparticules sont irradiées avec $I_{\max}$ et se situent à $d_{\text{Cell-AuNP}} \neq 0$ µm.

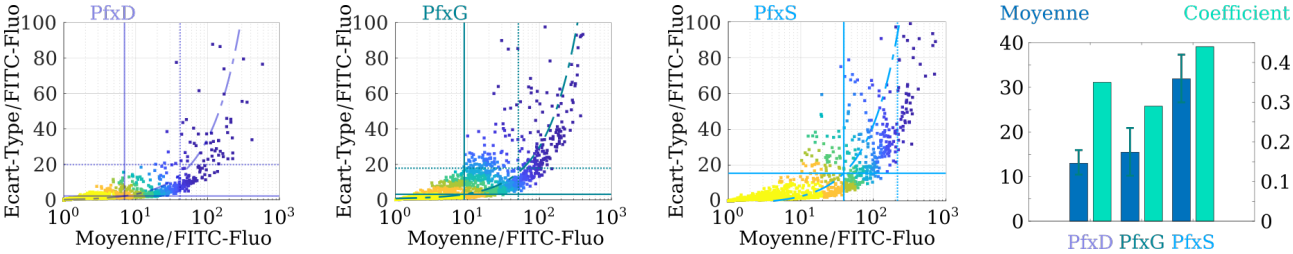
Les deux dernières approches sont à privilégier puisque cellules et nanoparticules ne sont pas mélangées. La distance et la fluence effective d'excitation des nanoparticules sont les grandeurs impliquées dans la perméabilisation et par conséquent dans l'incorporation du FITC-Dextran. La première module directement et spatialement les contraintes. La fluence influe sur le rayon des nano-bulles de vapeur créées et par conséquent sur les contraintes générées. Techniquement, la modulation des contraintes par la distance à fluence fixée peut être implémentée facilement pendant l'irradiation en intégrant les performances du laser de photoporation notamment son taux de répétition.

3.3.1 Photoporation avec séparateur et fluorescence intracellulaire

La corrélation entre écart-type et moyenne de la fluorescence intracellulaire — à l'échelle de la cellule unique — décrit l'uniformité de l'intensité d'émission dans le noyau cellulaire. Les trois méthodes de photoporation en flux (à distance, avec gaine de nanoparticules et en flux sans séparation) ont des allures très similaires (fig.5.7a, b et c). Par ailleurs, les échantillons pour lesquels les nanoparticules sont injectées séparément (à distance et gaine) ont des dispersions d'écart-type proches (traits pointillés horizontaux ~ 20 u.a.). En se limitant aux cellules exprimant du FITC-Dextran, la photoporation à distance présente un écart-type moyen de $\sim 13 \pm 3$ u.a. proche de la valeur de la configuration avec gaine $\sim 16 \pm 6$ u.a. (fig.5.7d). Ces deux dernières restent inférieures à la moyenne de l'écart-type de la photoporation en flux sans séparation qui vaut $\sim 32 \pm 7$ u.a.. La photoporation en flux sans séparation entre cellules et intermédiaires donne une uniformité de fluorescence plus dispersée. La fraction de cellules positives étant plus importante, cela augmente l'échantillon statistique et ainsi sa dispersion. En outre, la suspension de nanoparticules contribue de différentes manières à la perméabilisation selon la position individuelle de chaque intermédiaire plasmonique.

Le coefficient directeur de la corrélation entre écart-type et moyenne de fluorescence vaut 0.35, 0.29 et 0.44 pour la photoporation à distance, avec gaine et en flux respectivement. Ces valeurs très proches, notamment pour les cas de séparation, confirme que l'uniformité de la fluorescence est similaire (fig.5.7d). On peut en conclure que les mécanismes impliqués dans la perméabilisation sont communs entre les conditions où les deux phases, biologique et plasmonique, sont séparées.

Dans le cas d'une non-uniformité pour une approche donnée, l'hypothèse est que la perméabilisation ne permet



(a) Corrélation entre écart-type et moyenne FITC pour la Photoporation avec séparateur

(b) Corrélation entre écart-type et moyenne FITC pour la Photoporation avec gaine de AuNP

(c) Corrélation entre écart-type et moyenne FITC pour la Photoporation en flux

(d) Comparaison de la moyenne et du coefficient directeur des 3 configurations

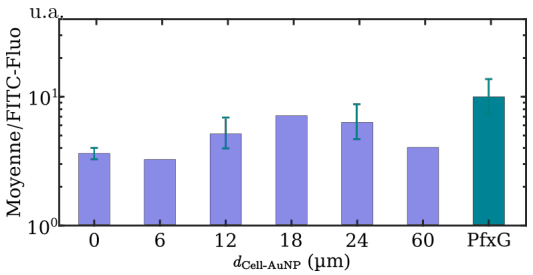
FIGURE 5.7 – **Caractérisation de l'efficacité d'incorporation pour la photoporation en flux dans différentes configurations de nanoparticules (AuNP).**
La fluorescence intracellulaire est comparée pour la méthode de photoporation à distance pour la valeur $d_{\text{Cell-AuNP}} \sim 18$ µm (PfxD), la méthode de photoporation avec gaine de nanoparticules (PfxG) et la méthode de photoporation en flux sans séparation (PfxS). Des diagrammes de dispersion sont tracés entre la fluorescence moyenne FITC et son écart-type pour les trois échantillons irradiés dans une puce microfluidique Verre-Si-Verre avec un canal central de 800 µm de large à un débit de 120 µl/min. L'orientation des nuages de points est obtenue par une régression linéaire dont le coefficient directeur est extrait. **Fig.a, b et c)** Corrélation entre écart-type et moyenne FITC pour respectivement PfxD, PfxG et PfxS. Les nuages de points ont des allures similaires aux tailles d'échantillons près. Les échantillons pour lesquels les AuNP sont injectées séparément ont des dispersions d'écart-type similaires (traits pointillés horizontaux ~ 20 u.a.). Le coefficient directeur de la courbe pointillée est extrait pour chaque condition. **Fig.d)** Moyenne de l'écart-type sur la population fluorescente et coefficient directeur de la courbe de tendance des diagrammes de corrélation pour les trois conditions. La photoporation à distance PfxD présente un écart-type moyen de $\sim 13 \pm 3$ u.a. proche de la valeur de PfxG $\sim 16 \pm 6$ u.a.. Ces deux dernières restent inférieures à la moyenne de l'écart-type de PfxS qui vaut $\sim 32 \pm 7$ u.a.. Les coefficients directeurs des courbes de tendances valent 0.35, 0.29 et 0.44 pour PfxD, PfxG et PfxS respectivement. La perméabilisation obtenue à distance est comparable en uniformité à la perméabilisation par gaine de AuNP.

pas le dépassement et la traversée de la barrière de l'endosome, une limitation pour différentes techniques de transfection [13]. Pour les trois approches développées, il apparaît que les cellules perméabilisées ont des uniformités de fluorescence comparables pour les cas de séparation. La photoporation en flux sans séparation réalise un marquage moins uniforme en moyenne, d'une part par dispersion statistique et d'autre part par conditions d'irradiations différentes (proximité entre nanoparticules et cellules, excitation laser...) conduisant probablement à la génération de nano-jets. Les intermédiaires de perméabilisation, nano-jets dans le cas de la photoporation en flux sans séparation ou contraintes issues de la dynamique de cavitation symétrique (oscillation ou onde de pression), aboutissent donc à des pores de même types mais pas nécessairement de même taille.

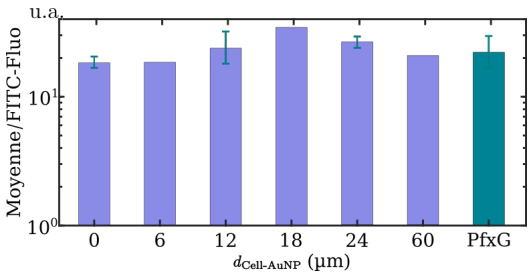
3.3.2 Photoporation avec séparateur et efficacité d'incorporation

Les deux approches, photoporation à distance avec séparateur ou avec gaine de nanoparticules, résultent en des efficacités d'incorporation différentes (fig.5.8a). En ne limitant pas la population étudiée, la fluorescence moyenne reflète la quantité incorporée de FITC-Dextran par la fraction positive de la population. La $d_{\text{Cell-AuNP}} \approx 18$ µm donne une incorporation légèrement plus faible que la photoporation avec gaine de particules (7 contre 8.5 u.a.). En se limitant aux cellules fluorescentes, cette configuration avec gaine permet une meilleure incorporation que la photoporation avec séparateur à distance nulle mais inférieure à ce que l'on obtient avec la photoporation à $d_{\text{Cell-AuNP}} \approx 18$ µm. En effet, les efficacités sont respectivement 25, 17 et 35 u.a. pour la gaine et les distances ~ 0 et ~ 18 µm (fig.5.8b).

Dans les cas où la distance est considérée quasi nulle (gaine et séparateur à $d_{\text{Cell-AuNP}} \approx 0$ µm), le nombre et la répartition des nanoparticules sont différents en faveur de la gaine (front double de nanoparticules de par



(a) Efficacité d'incorporation sur toute la population



(b) Efficacité d'incorporation sur la population fluorescente

FIGURE 5.8 – **Efficacité d'incorporation par photoporation en flux à distance avec séparateur et gaine de nanoparticules (PfxG).**
Comparaison des deux approches de photoporation avec séparation et à distance par l'efficacité d'incorporation. **Fig.a)** Efficacité d'incorporation mesurée sur toute la population de cellules. La $d_{\text{Cell-AuNP}} \approx 18$ µm résulte en une incorporation légèrement plus faible que la photoporation avec gaine de nanoparticules (7 contre 8.5 u.a.). **Fig.b)** Efficacité d'incorporation mesurée sur la population de cellules fluorescentes. Les efficacités sont respectivement 25, 17 et 35 u.a. pour la gaine et les distances ~ 0 et ~ 18 µm. La configuration avec gaine permet une meilleure incorporation que la photoporation avec séparateur à distance nulle mais inférieure à ce que l'on obtient avec la photoporation à $d_{\text{Cell-AuNP}} \approx 18$ µm.

et d'autre du flux porteur de cellules). La création de nanopores se fait ainsi sur une plus grande étendue de membrane. La fluence est en revanche mieux exploitée pour l'approche avec séparateur. Les contraintes sont plus importantes car les nano-bulles ont des rayons plus grands. Les valeurs de fluorescence intracellulaire, à petite distance, impliquent que la population a subit une meilleure perméabilisation en multipliant le site de génération de nano-bulles de rayons intermédiaires tout autour de la membrane avec la gaine de nanoparticules.

Or, la perturbation de l'écoulement avec l'irradiation est effective avec les deux approches à petites distances. Dans le cas de l'approche avec séparateur (front unique de nanoparticules), les cellules se retrouvent hors de la portée des nano-bulles. Dans le cas du front double, les sources acoustiques sont de part et d'autre des cellules, compensant les perturbations, d'où de meilleures peréabilisation et incorporation.

De même dans les cas où les fractions positives sont plus importants (gaine et séparateur à $d_{\text{Cell-AuNP}} \approx 18$ µm), les mêmes remarques sont faites concernant les paramètres plasmoniques (nombre de nanoparticules et fluence). Cependant, la fluorescence intracellulaire est plus importante pour la photoporation à distance. L'incorporation du FITC-Dextran, mesurée à $J+1$, est donc de meilleure qualité avec un front unique de nanoparticules et des cellules placées à $d_{\text{Cell-AuNP}} \approx 18 \pm 6$ µm. Cette amélioration est potentiellement due à la stabilisation des flux avec le séparateur. Par ailleurs, le même résultat s'explique par les contraintes générées. Dans le cas de la gaine, les faibles fluence et distance entraînent la mort des cellules fortement perméabilisées et ne survivent que celles n'ayant pas subie de contraintes critiques. En augmentant la distance, les contraintes sont modulées à rayon de nano-bulle fixé et la perméabilisation est ainsi uniforme sur tout l'échantillon.

Le front double de nanoparticules combiné à une fluence plus faible permet de photoporer plus de cellules avec une efficacité d'incorporation donnée. Le front unique avec séparateur à fluence maximale génère une fraction plus faible de cellules positives. Ces cellules perméabilisées incorporent cependant une quantité plus importantes de FITC-Dextran 10 kDa. L'augmentation du nombre de nanoparticules par un facteur deux (front double par rapport au front unique) augmente la probabilité de perméabilisation à l'échelle de l'échantillon mais n'améliore pas la perméabilisation à l'échelle de la cellule. La fluence et les perturbations sont donc les deux éléments limitant la performance de la photoporation avec gaine de nanoparticules.

Les approches de photoporation de cellules présentées peuvent être rassemblées deux à deux selon la disposition des nanoparticules dans le volume d'irradiation, sans mentionner le nombre de nanoparticules par cellules et la fluence. Dans le cas de la photoporation de cellules adhérentes, les nanoparticules adsorbées aux membranes ont une faible probabilité d'interagir entre elles (à part par la formation d'agrégats) ou de perturber l'excitation d'autre nanoparticules puisque qu'elles sont sur le même plan de la membrane cellulaire. De même, la photoporation en flux sans séparation place les nanoparticules autour des cellules y compris au voisinage très proche des membranes. S'il y a interaction, l'atténuation des effets est compensée par la proximité. Parallèlement, la photoporation avec séparation, que cela soit la gaine de nanoparticules ou le flux séparateur, irradient des volumes comportant une densité de nanoparticules. L'énergie optique apportée par le laser subie l'absorption de nanoparticules et de la diffusion. Toutes nanoparticules en aval de la première excitation ne reçoit pas la même fluence à cause de l'extinction de l'onde [66]. Un même type de comportement se produit avec la nano-bulle de vapeur générée par l'irradiation de la nanoparticule qui accentue la dispersion de la lumière [229]. Ces éléments altèrent alors les caractéristiques des nano-bulles générées dans le cas de l'excitation d'une suspension de nanoparticules.

Le résultat de l'excitation d'une nanoparticule isolée et d'une suspension de nanoparticules, toute chose égale par ailleurs, peut être légèrement différent [81]. La présence d'un nombre de nanoparticules dans le même volume peut favoriser la formation d'agrégats, équivalent à des structures plasmoniques de plus grandes tailles [8]. Le seuil de génération de nano-bulles ne change pas drastiquement mais le recouvrement des champs thermiques des agrégats ou le décalage de la fréquence de résonance des plasmons de surface peuvent abaisser sa valeur [73, 81, 126]. En terme de résultat et en négligeant la formation d'agrégats, la génération de nano-bulles de vapeur est tout de même réalisée avec une probabilité de nucléation qui sature avec la concentration de nanoparticules croissante [166].

Des modèles numériques sont établis pour rendre compte des différents paramètres plasmoniques et leur contribution au signal photo-acoustique (pression dans le milieu mesurée pendant le temps de vie de la bulle) [252]. Ces modèles sont appliqués à des nanoparticules de diamètre entre 10 et 90 nm, irradiées par des fluences plus faibles (1/10) que celles utilisées pour réaliser la photoporation en flux ici. Le signal de pression obtenu est linéaire avec la concentration de nanoparticules [253]. Cette dépendance est déjà exploitée en spectroscopie photo-acoustique où le signal acquis donne des informations sur le coefficient d'absorption de la solution [252]. Le signal photo-acoustique dépend donc de la densité optique de la solution où interviennent la concentration et la taille des nanoparticules. Des relations de linéarité sont rapportées entre la pression émise dans le milieu et le coefficient d'absorption [167, 252]. L'augmentation de la concentration de nanoparticules plasmoniques implique donc une énergie acoustique croissante dans le milieu.

L'augmentation de la concentration semble augmenter l'énergie acoustique récoltée post-irradiation. Cependant, même si la génération de nano-bulle n'est pas "inhibée", il apparaît que la linéarité du signal avec le coefficient d'absorption (dépendant de la concentration) est pertinente pour des nanoparticules de diamètre en deçà de 20 nm. Au delà, le signal varie en μ_a^n où μ_a est le coefficient d'absorption et $n < 1$. Cette saturation est justifiée par un écrantage de la part des nano-bulles environnantes [167]. Cela se réalise notamment par la dispersion du faisceau laser qui peut se manifester par un écart entre les mesures de fluence en amont d'une cuve contenant une suspension de nanoparticules et en aval [158]. Par ailleurs, le signal acoustique dépend du rayon maximal atteint par la bulle (énergie de la bulle et pression émise). Inversement, la pression environnante peut également influer sur la dynamique des bulles en cavitation et indirectement sur le signal émis.

Puisque les temps de génération des bulles sont bien inférieurs à la durée de l'impulsion laser, des ondes de pression sont potentiellement émises (génération de plasma, évaporation du liquide ou effondrement) en décalage selon la position des nanoparticules excitées [158]. Des suivis de la dynamique de cavitation, pour des vitesses initiales d'oscillation de bulles (donc un rayon initial donné), existent dans la littérature avec l'application d'une pression externe [190]. Selon la valeur de la pression et le type de signal (continu ou transitoire), les effondrement de bulles sont induits plus rapidement et donc les rayons $R_{\max}$ atteints sont plus petits. Les ondes émises pendant les oscillations ou l'effondrement sont moins intenses car l'énergie de la bulle est plus faible. Les valeurs de pression explorées sont compatibles avec ce qui a été mesuré pendant l'effondrement ($\sim 0.1 - 5$ MPa) ou lors de la génération de plasma juste avant le nucléation de la bulle (~ 400 MPa) [77, 82, 190].

L'irradiation d'une suspension de nanoparticules à $\sim 8 \cdot 10^7$ part./ml inhibe la croissance des nano-bulles de vapeur et donc atténue les contraintes émises pendant les phases d'oscillation ou d'effondrement de la bulle [158]. Cette influence de la pression est également visible dans l'induction et l'orientation des nano-jets observés à l'issue de l'effondrement de bulles micrométriques. Un front d'onde tend à diriger le jet à son opposé [246]. Ce dernier élément peut être mis à profit pour la génération de jet dans le cas des distances non nulles en limitant la répartition volumique des nanoparticules, dans la zone d'irradiation, dans la direction perpendiculaire au plan contenant les flux porteurs de cellules et de nanoparticules.

En dehors de cette configuration de focalisation verticale, l'atténuation des émissions acoustiques est effective et plus importante que la potentielle amplification que pourrait apporter le confinement dans un canal microfluidique [241, 242]. Il est intéressant de noter que l'atténuation est plus importante avec les fluences croissantes. Dans le cas des photoporation avec séparation, en estimant que les perturbations agissent ultérieurement, Les deux approches comportent des irradiations avec deux fluences différentes.

L'irradiation de la gaine de nanoparticules se fait avec une fluence 20%plus faible que l'approche avec séparateur. L'atténuation obtenue est donc moins importante que celle appliquée aux nanoparticules irradiées par $I_{\max}$. Cela peut expliquer d'une part la répartition des événement de perméabilisation, à l'échelle de l'échantillon, pour la photoporation avec gaine de nanoparticules puisque les nano-bulles sont plus petites mais plus homogènes et plus nombreuses. D'autre part, l'excitation à $I_{\max}$ génère des nano-bulles d'énergie supérieure au niveau de la face d'entrée. Les contraintes qui en découlent sont alors plus importantes et seraient cohérentes avec une meilleure perméabilisation.

4 Conclusions et perspectives : séparation des phases et modulation des contraintes

La génération de nano-bulles de vapeur autour de nanoparticules d'or irradiées est exploitée pour réaliser la photoporation en flux avec séparation entre cellules et intermédiaires plasmoniques. Le but de cette séparation est de pouvoir extraire, à terme, des cellules traitées sans nanoparticules ni débris à l'aide d'une géométrie microfluidique avec plusieurs sorties. Trois différentes conditions d'irradiation sont explorées pour être décrites par les fractions positives et les taux de viabilité. La caractérisation du dispositif opto-fluidique, conçu et réalisé dans le cadre de ce travail, se base sur les résultats obtenus dans les Chapitres 2 et 3 où la génération de nano-bulles de vapeur permet de réaliser la photoporation en flux.

La photoporation avec gaine de nanoparticules exploite deux fronts de nanoparticules irradiées avec une intensité de $I \sim 2$ J/cm^2. L'incorporation de l'agent exogène est alors favorisée puisque les nanopores ainsi créés, dont le nombre dépend de la concentration des nanoparticules, sont répartis autour de la membrane cellulaire. Comparée à la photoporation en flux où la fluence effective est 25% plus importante, le nombre est multiplié par deux mais le rayon de ces pores est plus petit. Cela se répercute sur l'efficacité d'incorporation puisque la fluorescence intracellulaire moyenne est plus faible dans le cas de la photoporation avec gaine de nanoparticules (25 contre 80 u.a.).

La fraction positive obtenue par cette méthode est inférieure à la photoporation en flux, toute chose égale par ailleurs. Elle est de l'ordre de 30% à cause d'une faible viabilité après irradiation traduite par $f_s \sim 40\%$. En comparaison, la photoporation en flux implique 50% de perte de cellules. La croissance de ces dernières pour l'approche "phases séparées" est cependant meilleure avec un facteur de croissance f_c de ~ 0.8 contre ~ 0.4 pour la photoporation en flux. D'une part, dans le cas de la photoporation, on peut attribuer la faible survie au nombre de nanoparticules – et donc de nanopores – qui est deux fois plus grand que dans le cas de la photoporation en flux d'une suspension, à la même concentration d'intermédiaires plasmoniques. D'autre part, la reprise de croissance enregistrée pour l'approche séparée est probablement liée à la plus faible fluence effective qui entraîne la création de nanopores plus petits, donc plus facilement réparables par la cellule.

La chute de viabilité peut également être causée par les perturbations des flux porteurs pendant l'irradiation. Ce phénomène, déjà observé pour la photoporation en flux, désorganise donc l'écoulement cellule-nanoparticules. Malgré la présence de nanoparticules, l'incorporation est limitée car les cellules sont éjectées de leur trajectoire et les nano-bulles de vapeur sont alors sans effet pour la photoporation. En outre, le stress mécanique supplémentaire appliqué aux cellules en écoulement a des conséquences sur leur viabilité. Par conséquent, le maximum de fluence doit être éloigné des cellules que cela soit pour limiter leur exposition ou les éloigner des perturbations.

La deuxième approche exposée consiste à inverser les entrées cellules et nanoparticules en maintenant les deux suspensions séparées. L'injection des nanoparticules par le canal central permet alors de les irradier avec le maximum de fluence du faisceau laser. La génération de nano-bulles est alors plus importante (bulles plus grandes) et est exploitée des deux côtés du flux porteur d'intermédiaires plasmoniques puisque les flux adjacents transportent des cellules. La diminution ainsi obtenue du nombre de nanoparticules d'un facteur deux améliore à la fois le facteur de survie et le facteur de croissance par rapport à l'approche utilisant deux fronts ($f_s \sim 52$ et $f_c \sim 1.4$). Cependant, la fraction positive chute à des niveaux comparables aux contrôles ($\sim 10\%$). L'explication réside potentiellement dans un autre type de perturbations où l'on observe un front de déplacement dans la direction orthogonale à l'écoulement. Ce déplacement éloigne alors les cellules des sites de génération des

nanoparticules et les met hors de portées des effets acoustiques d'intérêt.

La dernière méthode se base sur l'introduction d'un liquide séparateur qui modifie la distance entre le flux porteur de cellules et les sites de génération de nano-bulles, en l'occurrence, l'unique flux porteur de nanoparticules. En modifiant les débits de manière couplée et à débit total constant, la perméabilisation de membranes cellulaires en flux est réalisée à différentes distances à des fractions positives différentes. Le maximum de la fraction de cellules positives atteint $\sim 25\%$ pour une distance moyenne de 18 µm. De manière intéressante, la viabilité, faible pour les distances plus petites, augmente à partir de 12 µm – le facteur de survie f_s passe de 50 à $\sim 75\%$ pour devenir comparable aux valeurs contrôles. Le facteur de croissance en revanche ne semble pas évoluer avec la distance.

Cette approche offre plusieurs avantages quand bien même la fraction positive est légèrement inférieure à la photoporation en flux ou la photoporation avec gaine de nanoparticules. L'irradiation s'applique essentiellement aux nanoparticules et non plus aux cellules. En lien avec l'interaction avec le laser de photoporation, une autre observation concerne les perturbations se produisant lors de l'irradiation. On observe une stabilisation de l'écoulement à partir d'une certaine distance de la position du laser. Cette distance de $d_{\text{Cell-AuNP}} \sim 9$ µm (moyenne de deux réalisations) marque une transition vers un écoulement plus stable et une meilleure viabilité. En conclusion, la fraction positive de 25% et une viabilité améliorée (80%) font de cette approche la meilleure stratégie des trois approches étudiées dans les même conditions optiques.

La présence d'un optimum de la fraction positive est cohérente avec la littérature dans le cas de perméabilisation par phénomène acoustique ou opto-acoustique [83, 160, 241]. Cela s'explique par l'équilibre entre taille et réparation des nanopores créés. En effet, ils permettent l'incorporation tout en étant réparables par les voies de la cellule. Les seuils de contraintes typiques sont entre 3 et 20 kPa en traction [82, 106, 160]. L'effet de ces contraintes peut être représenté par un taux de déformation de la membrane cellulaire en faisant l'hypothèse d'un objet élastique. En considérant la variation de la surface membranaire, le seuil de déformation critique $\epsilon_c = \Delta A/A$ est évalué entre $\sim 3\%$ voire 40% en considérant par exemple la durée d'application de la contrainte et son caractère impulsionnel [104, 224, 248].

L'efficacité d'incorporation obtenue par photoporation en flux est 2.6 fois plus importante que celle résultant d'une photoporation à distance à l'optimum. Cela suppose que les mécanisme de création de nanopores sont différents. En l'occurrence, dans le cas de la photoporation en flux, les conditions d'irradiation et la distance de séparation entre cellules et nanoparticules ont de grandes chances de favoriser la génération de nano-jets orientés vers la membrane des cellules à l'effondrement de la nano-bulles de vapeur. En supposant leur contribution négligeable, les déformations relatives engendrées pendant la photoporation à distance sont alors issues des oscillations de la bulles ou de l'onde de pression émise à l'effondrement.

Le seuil de déformation de 3% semble cohérent avec la valeur de la distance optimale observée. En considérant les deux contributions à la déformation de la membrane (oscillation et onde de pression), on estime une durée de vie de la bulle à $\sim 200 - 600$ ns. D'une part, cette valeur est cohérente avec les valeurs de la littérature dans le cas d'une génération de nano-bulles plasmoniques dans des conditions d'excitation voisines (532 nm,$4 - 5$ns,$1 - 2$ J/cm^2) [71]. D'autre part, cette estimation est cohérente avec l'équation de Rayleigh, donnant un rayon de la bulle à ~ 1 µm. Le paramètre de distance de séparation γ permettant la génération de nano-jets impose que $d_{\text{Cell-AuNP}} \leqslant 2$ µm. Dans le cas de la photoporation à distance, notamment à la distance critique de $d_{\text{Cell-AuNP}} \sim 18$ µm, la perméabilisation ne se fait donc pas par génération de nano-jet.

Un autre intérêt de la photoporation à distance est la modulation de la déformation de la membrane pour adapter l'étape de perméabilisation aux différents seuils critiques propres à chaque lignée cellulaire. En effectuant l'écoulement à débit total fixé, la modulation en temps réel de la distance *via* deux débits couplés n'augmente pas les contraintes hydrodynamique sur les cellules et permet un réglage rapide. La placement du laser par rapport au flux porteur de nanoparticules est également avantageux puisque ce dernier reste fixe et son maximum coïncide avec les nanoparticules et non pas les cellules. Ce positionnement a son importance puisque l'excitation à $I_{\max}$ génère des nano-bulles d'énergie supérieure au niveau de la face d'entrée. Les contraintes qui en découlent sont alors plus importantes et seraient cohérentes avec une meilleure perméabilisation. La même démarche appliquée à l'approche avec gaine de nanoparticules nécessiterait de revoir le profil spatial du faisceau laser, avec un axicon (systèmes optiques à symétrie cylindrique) par exemple, pour diminuer l'intensité au niveau des cellules et l'orienter sur les nanoparticules. De cette manière, l'irradiation serait optimisée et l'écoulement des cellules stabilisé.

Les perturbations observées semblent être causées par l'interaction du laser ns Q-switch avec le substrat en verre qui constitue les faces d'entrée et de sortie du laser dans la puce microfluidique. La génération de plasma peut se produire dans le milieu liquide du canal ou au voisinage du verre [254, 255]. En présence d'un absorbant, le laser Q-switch peut générer un plasma et une onde de choc dans le substrat irradié, ici le verre [256]. Les émissions accompagnant ce phénomène peuvent ainsi limiter la stabilité de l'écoulement et la viabilité des cellules. D'une part, la photoporation à distance permet d'éloigner les cellules des zones d'interactions avec le laser et ne sont exploités que les phénomènes acoustiques de sources plasmoniques. D'autre part, une profondeur de canal plus importante permettra l'atténuation de ces phénomènes parasites et potentiellement déplacer l'optimum de perméabilisation.

En effet, les perturbations introduisent un biais. L'optimum obtenu à $d_{\text{Cell-AuNP}} \sim 18$ µm est probablement un maximum décalé par les perturbations qui empêche la visualisation de l'effet isolé de la photoporation. Pour des distances plus petites, l'efficacité d'incorporation doit être plus importante, quand bien même la viabilité, et par conséquent la fraction positive, seront plus faibles. L'approfondissement du canal à concentration de nanoparticules fixée diminuerait donc la densité volumique d'intermédiaires plasmoniques et par conséquent les phénomènes inhibant les émissions des nano-bulles [158, 190]. Cette densité peut être encore réduite en diluant en amont la suspension de nanoparticules ou en exploitant un étage de focalisation verticale. Pour le premier point, la diminution de la concentration dans le cadre de la photoporation en flux sans séparation (résultats du Chapitre 3) a conduit à une amélioration de la viabilité et de la perméabilisation. Le deuxième point permet l'organisation dans les deux plans (vertical et horizontal) de l'écoulement des nanoparticules pour augmenter la fluence effective d'irradiation.

L'amélioration du protocole de photoporation à distance est réalisable en diminuant la densité de nanoparticules et éloignant les sources de perturbations. Comme précisé précédemment, à condition plasmonique fixée (fluence, nanoparticule et donc taille de la bulle), la réduction de la distance optimale et l'éloignement des bords favorisent la création de nano-jets orientés vers la membrane cellulaire à l'effondrement des nano-bulles. De façon similaire, la réduction du paramètre de distance γ, comparant $d_{\text{Cell-AuNP}}$ au rayon de la bulle est possible avec des nano-bulles plus grandes. D'autres nano-structures plasmoniques peuvent les générer si on considère que le système actuel est limité en fluence par l'endommagement du verre utilisé induit par laser. Mais en combinant la focalisation 3D (horizontale et verticale) avec une concentration adéquate de nanoparticules, la coalescence de nano-bulles générées autour de nanoparticules est possible [257]. Les cavités ainsi générées sont d'énergie plus

grandes d'une part. Les contraintes émises en cas d'absence de parois sont alors plus importantes. Dans le cas de la proximité d'une membrane par exemple, les nano-jets seront plus susceptibles d'être créés et dirigés vers cette dernière. La perméabilisation et ses performances seront alors comparables aux résultats obtenus avec la photoporation en flux sans séparation.

Des différentes approches présentées, deux sont à explorer plus en détail. Grâce à la génération de nano-jets, la photoporation en flux sans séparation, optimisée en concentration de nanoparticules, réalise des fractions positives, un taux de viabilité et une efficacité d'incorporation intéressants pour les applications *in vitro*. La photoporation à distance, avec un taux inférieur mais une meilleure efficacité d'incorporation que l'approche avec gaine de nanoparticules, permet de moduler les efforts mécaniques subies par les cellules en déplaçant ces dernières le long des profils spatiaux de contraintes. Elle permet par ailleurs la séparation des cellules et des nanoparticules tout au long du protocole et la récupération de cellules traitées sans nanoparticules. Une optimisation du dispositif opto-fluidique rendrait possible même la modulation des contributions des différents phénomènes impliqués dans la perméabilisation des membranes cellulaires comme les oscillations des nano-bulles, la génération de nano-jets ou encore les émissions d'onde acoustiques.

CHAPITRE 6

CONCLUSION : PHOTOPORATION EN FLUX AVEC SÉPARATEUR, VIABLE ET VERSTATILE

Préambule :

La première étape des études réalisées consiste, à partir d'une source émettant des impulsions de $4-5$ ns *à* 532 nm*, à concevoir et créer un dispositif optique réalisant la photoporation de cellules adhérentes par génération de nano-bulles de vapeur (Chapitre 2). Les performances de l'appareillage sont décrites par trois grandeurs principales : la fraction positive, la viabilité et enfin l'efficacité d'incorporation.*

En se basant sur la focalisation hydrodynamique, le protocole de photoporation est adapté en flux en utilisant des cellules adhérentes remises en suspension et en maintenant les mêmes conditions d'irradiation des nanoparticules (Chapitre 3). Dans un premier temps, ces dernières sont injectées via une suspension cellulaire sans favoriser l'adsorption (sans contact). La focalisation réalise l'alignement de la suspension pour être en adéquation avec la géométrie du faisceau laser de photoporation.

Le contrôle introduit par la focalisation hydrodynamique (alignement avec le faisceau laser) est adapté pour moduler la distance entre cellules et nanoparticules (Chapitre 4). Une étude numérique se basant sur la méthode des éléments finis couplée à des expériences est effectuée sur l'écoulement bi-phasique dans le cas d'une géométrie de focalisation avec un ou deux niveaux et dans un ou deux plans.

Une méthode de photoporation à distance de cellules biologiques est réalisée dans une puce microfluidique (Chapitre 5). Plusieurs approches,toutes basées sur la focalisation hydrodynamique, sont testées et évaluées selon les grandeurs introduites précédemment (taux, viabilité et efficacité). L'approche introduisant un flux séparateur se démarque par le contrôle de la distance, l'optimisation de l'excitation des nanoparticules et la viabilité du procédé. Elle permet par ailleurs de simplement extraire un échantillon sans nanoparticules.

1 Photoporation de cellules adhérentes ou en suspension par générations de nano-bulles de vapeur

Le design optique a permis de développer un dispositif de transfection de cellules – adhérentes ou en suspension – optimisé pour la génération de nano-bulles de vapeur. La base de l'approche est l'utilisation des intermédiaires plasmoniques comme site de nucléation. En utilisant la même source d'irradiation avec une géométrie adaptée, le montage optique permet de perméabiliser des cellules adhérentes en boîte de culture et des cellules en suspension dans une puce microfluidique.

La quantification de la perméabilisation est faite par imagerie de fluorescence, analysée par des algorithmes de segmentation d'images pour mesurer la fraction positive, le taux de viabilité et l'efficacité d'incorporation. Cette analyse vise à décrire la perméabilisation des membranes cellulaires grâce à l'incorporation d'une macromolécule de référence à concentration fixée (FITC-Dextran 10 kDa à 2 mg/ml).

La preuve de génération de nano-bulles de vapeur obtenue à l'aide du protocole de photoporation de cellules adhérentes a permis de transposer l'approche en flux dans différentes configurations en introduisant une composante de distance entre source de nucléation des nano-bulles de vapeur et membranes cellulaire à perméabiliser.

Cet outil de photoporation est compatible avec différentes lignées cellulaires (MCF7, MDA, SUM, MCF10A non présentées et non quantifiées) montrant son utilité dans les problématiques de recherches du groupe et sa versatilité en terme de type cellulaire adhérents. Il est évident que les fractions positives et les taux de viabilité très intéressants sont les points forts de cette technique de perméabilisation.

2 Perméabilisation par photoporation avec génération de nano-bulles de vapeur (VNB)

La fraction positive globale obtenue en photoporation de cellules adhérentes (cellules en culture en boîte de culture, Chapitre 2) varie avec la concentration de nanoparticules. Les trois valeurs de concentrations de nanoparticules – 8, 16 et ~ 80 part./ml – génèrent des taux entre ~ 60 et $\sim 80\%$ de réponse positive. La description globale de la perméabilisation des échantillons photoporés est cohérente avec une perméabilisation des membranes cellulaires par génération de nano-bulles. La littérature rapporte des valeurs de seuil de transfection au delà duquel la génération de nano-bulles est le mécanisme privilégié ($\sim 30 - 40\%$) [71, 138]. Ce mécanisme dépendant de la fluence, le profil d'intensité du faisceau laser permet donc d'accéder à différentes fractions positives ou efficacités d'incorporation du FITC-Dextran.

La fraction positive locale permet de visualiser la corrélation avec la distribution d'intensité du faisceau laser elliptique utilisé pour l'irradiation. Elle évolue spatialement à l'échelle d'un échantillon et montre une transition pour $I \sim 0.3$ J/cm^2 pour les deux grandeurs de fluorescence, fraction et efficacité. Dans la configuration étudiée, le seuil de génération de nano-bulles pour réaliser la photoporation se situe donc entre 0.3 et 0.8 J/cm^2. Dans cet intervalle, la fraction positive atteint $\sim 40\%$ et la fluorescence moyenne est multipliée par un facteur 4. Ces valeurs sont cohérentes avec les valeurs de la littérature qui caractérisent les mécanismes de photoporation thermique et par nano-bulles ($\sim 0.1 - 1$ J/cm^2) [81, 140, 142].

La distribution de l'intensité croissante vers le centre du faisceau va générer des nano-bulles de rayons de

plus en plus grands. L'augmentation du nombre de nanoparticules par cellules induit quant à lui un nombre de nanopores plus grand. Dans les deux cas, la surface effective de la perméabilisation est plus grande. La comparaison de la fluorescence indique que l'incorporation va varier selon le nombre de nanopores. L'évolution de la fluorescence pour la concentration ($[AuNP] \times 10$) indique donc qu'un nombre de nanopores plus important nécessiterait des temps de réparation plus long pendant lesquels le FITC-Dextran incorporé diffuse en dehors du cytoplasme, contrairement à des nanopores de taille plus restreinte. Cela peut expliquer ainsi la fraction positive plus faible.

Sans pré-incubation, la photoporation en flux (suspension cellules-nanoparticules dans un flux porteur focalisé, Chapitre 3) renvoie une efficacité d'incorporation (fluorescence intracellulaire) comparable à la photoporation de cellules adhérentes. De ce fait, la perméabilisation obtenue se fait par le biais de nano-bulles de vapeur. À plus forte raison, cette même grandeur est supérieure à la photoporation de cellules adhérentes avec $10\times$ la concentration de nanoparticules. Comme l'adsorption n'est pas favorisée en flux, on peut penser que les nano-bulles sont formées et leur cavitation permet la formation d'un nano-jet à l'effondrement car la distance de séparation est non nulle (présence d'une couche de liquide). Selon les conditions d'irradiation et les configurations microfluidiques testées, les fractions positives obtenues par photoporation en flux varie entre ~ 40 et $\sim 75\%$.

Une limitation existe cependant et est induite par la fréquence de répétition du laser de photoporation. Les débits microfluidiques utilisés sont bornés et permettent un traitement de $\sim 50 - 150$ cell./s. Cette cadence est comparable à certaines valeurs disponibles dans la littérature et obtenus par des techniques opto-fluidiques mais reste faible devant des techniques purement fluidiques (hydroporation). La recherche d'un optimum de concentration de nanoparticules et la photoporation à l'aide d'un laser à fréquence de répétition plus élevée permettront d'améliorer la viabilité et d'augmenter la cadence de traitement.

L'étape suivante a été non seulement de ne pas favoriser l'adsorption des nanoparticules aux cellules mais en plus de les séparer tout au long de l'irradiation en les injectant par des canaux différents (cellules et nanoparticules à distance en flux, Chapitre 5). Trois approches sont testées : centrage des nanoparticules, gaine de nanoparticules et enfin flux séparateur entre flux de cellules et flux de nanoparticules. Elles exploitent toutes la génération de nano-bulles de vapeur pour réaliser la perméabilisation des cellules en flux.

La photoporation avec gaine de nanoparticules exploite deux fronts de nanoparticules irradiées avec une intensité de $I \sim 2$ J/cm^2. L'incorporation de l'agent exogène est alors favorisée puisque les nanopores ainsi créés, dont le nombre dépend de la concentration des nanoparticules, sont répartis autour de la membrane cellulaire. La deuxième approche exposée consiste à inverser les entrées cellules et nanoparticules en maintenant les deux suspensions séparées. L'injection des nanoparticules par le canal central permet alors de les irradier par le maximum de fluence du faisceau laser. La génération de nano-bulles est alors plus importante (bulles plus grandes) et exploitée des deux côtés du flux porteur d'intermédiaires plasmoniques.

Le taux de transfection obtenu par la méthode "en gaine" est de l'ordre de 30% et par la méthode "centrées" de l'ordre de 10%. Comparé à la photoporation en flux où la fluence effective est 25% plus importante, le nombre des nanopores est multiplié par deux dans le cas de la gaine mais le rayon de ces pores est plus petit. Cela a un impact sur l'efficacité d'incorporation puisque la fluorescence intracellulaire moyenne est plus faible ($\sim 68\%$) dans le cas de la photoporation avec gaine de nanoparticules. Quant à la deuxième approche, l'explication du faible taux (en lien avec la viabilité présentée ci-dessus) réside potentiellement dans un autre type de perturbation où l'on observe un front de déplacement dans la direction orthogonale à l'écoulement. Ce

déplacement éloigne alors les cellules des sites de génération des nanoparticules et les met hors de portées des effets acoustiques d'intérêt.

La dernière méthode se base sur l'introduction d'un liquide séparateur qui modifie la distance entre le flux porteur de cellules et les sites de génération de nano-bulles, en l'occurrence, l'unique flux porteur de nanoparticules. En modifiant les débits de manière couplée et à débit total constant, la perméabilisation de membranes cellulaires en flux est réalisée à différentes distances à des fractions positives différentes. Le maximum de la fraction de cellules positives atteint $\sim 25\%$ pour une distance moyenne de 18 µm.

3 Viabilité des cellules photoporées par nano-bulles de vapeur

Les taux de viabilité obtenus avec la photoporation de cellules adhérentes avec différentes concentrations de nanoparticules sont élevés (autour de $\sim 90\%$). La croissance des cellules irradiées n'est pas impactée puisque le facteur de croissance est comparable aux échantillons de contrôle. La morphologie des cellules et le marquage Hoechst, pouvant indiquer la présence de cellules en apoptose, sont cohérents avec la mesure de viabilité et ne révèlent pas de corrélation entre hausse de la concentration à fluence fixée et baisse de la viabilité.

La faible viabilité est la limitation principale du premier protocole en flux (elle varie entre 40 et $\sim 80\%$). Les différents contrôles flux ont montré un faible impact du circuit d'écoulement sur la viabilité des cellules. Mais le cumul des différentes sources de stress pendant le traitement comme la perméabilisation par photoporation, les contraintes de cisaillement pendant l'écoulement en canal microfluidique et le couplage potentiel avec les étapes de préparation d'échantillons (remise en suspension, rinçage et centrifugation) entraîne la mort cellulaire. Cependant, la réduction de la concentration de nanoparticules a permis d'améliorer la fraction de cellules vivantes de 40 à $\sim 75\%$. La comparaison entre l'influence du nombre d'impulsion et le nombre de nanoparticules au voisinage des cellules montrent que la valeur critique de ce dernier est entre ~ 10 part./cell. et ~ 30 part./cell. où la viabilité est détériorée.

Pour la photoporation avec gaine de nanoparticules, la fraction positive obtenu ($\sim 30\%$), inférieur à la photoporation en flux toute chose égale par ailleurs ($\sim 54\%$), intègre la viabilité qui, mesurée avec le facteur de survie f_s après irradiation, est égale à $\sim 40\%$. En comparaison, la photoporation en flux génère 50% de perte de cellules. La croissance des ces dernières pour l'approche de phases séparées est cependant meilleure avec un facteur de croissance f_c de ~ 0.8 contre ~ 0.4 pour la photoporation en flux. D'une part, on peut attribuer la faible survie au nombre de nanoparticules. De façon cohérente, la diminution ainsi obtenue du nombre de nanoparticules – avec l'approche où elles sont centrées – d'un facteur deux améliore à la fois le facteur de survie et le facteur de croissance par rapport à l'approche utilisant deux fronts ($f_s \sim 52$ et $f_c \sim 1.4$). Cependant, la fraction positive chute à des niveaux comparables aux contrôles ($\sim 10\%$). D'autre part, la reprise de croissance enregistrée semble dépendre de la fluence dont la valeur effective est plus faible dans le cas de la gaine de nanoparticules. Les nanopores créés sont donc plus petits et par conséquent plus facilement réparables par la cellule.

La chute de viabilité peut également être causée par des perturbations qui sont observées pendant l'irradiation des flux porteurs, autant pour l'approche avec gaine que l'approche avec nanoparticules centrées. Ce phénomène déjà observé pour la photoporation en flux désorganise fortement l'écoulement cellules-nanoparticules. Contrairement à l'augmentation de la concentration de nanoparticules qui conduit directement à la création de plus de nanopores, un nombre supérieur d'impulsions semble causer des effets sur le long terme *via* les contraintes hydrodynamiques supplémentaires : les impulsions supplémentaires génèrent un effet non pas par l'intermédiaire

de nanoparticules mais *via* l'interaction avec les parois du canal, potentiellement au détriment de la viabilité. Par ailleurs, malgré la présence de nanoparticules, l'incorporation est limitée car les cellules sont éjectées de leur trajectoire et les nano-bulles de vapeur sont alors sans effet pour la photoporation. En outre, le stress mécanique supplémentaire appliqué aux cellules en écoulement a des conséquences sur la viabilité. Le maximum de fluence doit être éloigné des cellules que cela soit pour limiter leur exposition ou les éloigner des perturbations.

4 Photoporation en flux à distance avec séparateur

La dernière méthode introduite de photoporation en séparant les deux phases se base sur l'introduction d'un liquide séparateur qui modifie la distance entre le flux porteur des cellules et les sites de génération de nano-bulles, en l'occurrence, l'unique flux porteur de nanoparticules. Le maximum de la fraction de cellules positives atteint $\sim 25\%$ pour une distance moyenne de 18 µm. De manière intéressante, la viabilité, faible pour les distances plus petites, augmente à partir de 12 µm – le facteur de survie f_s passe de 50 à $\sim 75\%$ pour devenir comparable aux valeurs contrôles. Le facteur de croissance des cellules en revanche ne semble pas évoluer avec la distance.

Cette approche offre plusieurs avantages quand bien même la fraction positive est légèrement inférieur à la photoporation avec gaine de nanoparticules ou à la photoporation en flux. L'irradiation s'applique essentiellement aux nanoparticules et non plus sur les cellules et on a une stabilisation de l'écoulement à partir d'une distance de la position du laser. Cette distance de $d_{\text{Cell-AuNP}} \sim 9$ µm marque une transition vers un écoulement plus stable et une meilleure viabilité. En conclusion, la fraction positive de 25% et une viabilité améliorée (80%) font de cette approche la meilleure stratégie des trois méthodes avec séparation exposées.

L'efficacité d'incorporation obtenue par photoporation en flux est 2.6 fois plus importante que celle résultant d'une photoporation à distance à l'optimum. Cela suppose que les mécanismes de création de nanopores sont différents. En l'occurrence, dans le cas de la photoporation en flux, les conditions d'irradiation et la distance de séparation entre cellules et nanoparticules favorisent la génération de nano-jets orientés vers la membrane des cellules à l'effondrement de la nano-bulles de vapeur. En supposant leur contributions négligeables, les déformations relatives engendrées pendant la photoporation à distance sont alors issues des oscillations de la bulle ou de l'onde de pression émise à l'effondrement.

En effet, en considérant les deux contributions à la déformation de la membrane (oscillation et onde de pression), on estime une durée de vie de la bulle à $\sim 200 - 600$ ns. D'une part, cette valeur est cohérente avec les valeurs de la littérature dans le cas d'une génération de nano-bulles plasmoniques dans des conditions d'excitation voisines (532 nm,$4 - 5$ns,$1 - 2$ J/cm^2) [71]. D'autre part, cette estimation correspond, avec l'équation de Rayleigh, à un rayon de bulle de ~ 1 µm. Le paramètre de distance de séparation γ permettant la génération de nano-jets impose que $d_{\text{Cell-AuNP}} \leqslant 2$ µm. Dans le cas de la photoporation à distance, notamment à la distance critique de $d_{\text{Cell-AuNP}} \sim 18$ µm, la perméabilisation ne se fait donc pas par génération de nano-jets.

La présence d'un optimum de la fraction positive est cohérente avec la littérature dans le cas de perméabilisation par phénomène acoustique ou opto-acoustique [83, 160, 241]. Cela s'explique par l'équilibre entre création de nanopores permettant l'incorporation et pouvant être réparés par la cellule. En considérant la variation de la surface membranaire, le seuil de déformation critique $\epsilon_c = \Delta A/A$ est évalué entre $\sim 3\%$ voire 40% en considérant par exemple la durée d'application de la contrainte et son caractère impulsionnel. Dans notre cas, le seuil de 3% semble cohérent avec la valeur de la distance optimale observée [104, 224, 248].

5 Réponse cellulaire à un stress mécanique et améliorations techniques de la perméabilisation

5.1 Propriétés mécaniques des cellules et efficacité de perméabilisation

Au delà de la vitesse de croissance, les cellules cancéreuses se distinguent des cellules saines *via* certaines propriétés physiques et morphologiques comme la rigidité ou l'élasticité. Plusieurs études utilisant l'AFM (Atomic Force Microscopy) se sont intéressées aux propriétés biomécaniques des cellules biologiques comme la rigidité, l'adhésion ou la morphologie (dimension, rugosité) [258–261]. D'autres équipes ont travaillé sur l'aspect biomécanique des cellules soit soumises à un écoulement microfluidique, soit à une onde de choc [84, 145, 146, 262, 263]. Des techniques utilisant des dispositifs fluidiques à géométries particulières ou de la spectroscopie basée sur la rotation d'éléments paramagnétiques soumis à un champ ont permis d'établir plusieurs propriétés comme la déformabilité, le frottement de surface ou encore le caractère liquide viscolélastique du cytoplasme [264, 265].

Ces données peuvent être utiles pour quantifier ou qualifier le comportement de cellules et ses variabilités (saines ou non) face à la génération des nano-bulles de vapeur et le protocole de photoporation. Pour continuer dans l'optique de la sélectivité de perméabilisation, il serait intéressant d'isoler deux cellules (résolution cellule unique) ayant subi une photoporation mais avec un résultats différents (perméabilisées ou non, différents niveaux de fluorescence ou comportement post-perméabilisation) et de les soumettre à des analyses biomécaniques. Cela permettrait d'une part de mieux cerner les aspects différenciant les deux types cellulaires et d'autre part d'orienter l'approche de photoporation à distance pour éventuellement plus d'efficacité ou plus de sélectivité selon besoins [266].

5.2 Mécanisme de perméabilisation et réparation de la membrane cellulaire

La séparation des phases biologiques et plasmoniques tout au long du protocole de photoporation en flux à distance est une vraie plus-value pour les applications *in vivo*. Avec la distance optimale, il est envisageable et réaliste d'implémenter une sortie permettant l'extraction séparée des flux porteurs de cellules et de nanoparticules respectivement. Bien entendu, cette extension du dispositif est efficace sous réserve que les perturbations observées pendant l'irradiation dans certaines configurations soient atténuées.

Des différentes approches présentées, deux sont à explorer plus en détails. La photoporation en flux sans séparation avec une concentration de nanoparticules réduite réalise des taux de perméabbilisation, de viabilité et une efficacité d'incorporation intéressants pour les applications *in vitro* grâce à la génération de nano-jets. Cependant, l'échantillon extrait contient des nanoparticules d'or ou assimilé et nécessite donc une étape de filtration pour les éliminer.

La photoporation à distance, avec un taux inférieur mais avec une meilleur efficacité d'incorporation que l'approche avec gaine de nanoparticules, permet de moduler les efforts mécaniques subis par les cellules en déplaçant ces dernières le long des profils spatiaux de contraintes. Une optimisation du dispositif opto-fluidique rendrait possible même la modulation des contributions des différents phénomènes impliqués dans la perméabilisation des membranes cellulaires comme les oscillations des nano-bulles, la génération de nano-jets ou encore les émissions d'onde.

La modulation de la déformation de la membrane est la clé pour adapter l'étape de perméabilisation aux

différents seuils critiques propres à chaque lignée cellulaire. En effectuant l'écoulement à débit total fixé, la modulation en temps réel de la distance *via* deux débits couplés n'augmente pas les contraintes hydrodynamiques issues des nano-bulles (et non de l'écoulement) sur les cellules et permet un réglage rapide. Le placement du laser par rapport au flux porteur de nanoparticules est également avantageux puisque ce dernier reste fixe et son maximum coïncide avec les nanoparticules et non pas les cellules.

L'amélioration du protocole de photoporation à distance est réalisable en diminuant la densité de nanoparticules en éloignant les sources de perturbations. Comme précisé précédemment, la réduction de la distance optimale et l'éloignement des bords (canal plus profond) favorisent la création de nano-jets orientés vers la membrane cellulaire à l'effondrement des nano-bulles. De façon similaire, la réduction du paramètre de distance γ est possible avec des nano-bulles plus grandes.

D'autres nano-structures plasmoniques peuvent les générer si on considère que le système actuel est limité en fluence par l'endommagement induit par laser du verre utilisé. Mais en combinant la focalisation 3D (horizontale et verticale) avec une concentration adéquate de nanoparticules, la coalescence de nano-bulles générées autour de nanoparticules est possible [257]. Les contraintes émises de ces cavités plus énergétiques en cas d'absence de parois sont alors plus importantes. Dans le cas de la proximité d'une membrane par exemple, les nano-jets seront plus susceptibles d'être créés et dirigés vers cette dernière.

Ce dispositif peut non seulement servir à évaluer rhéologiquement les lignées cellulaires mais aussi d'induire différentes gammes de tailles de nanopores pour suivre les mécanismes de réparation. Selon la taille du pore, le processus de "re"-fermeture du pore a d'abord été pensé passif par réorganisation des phospholipides de la membrane. À cause de la tension de la membrane et du cytosquelette, ce mécanisme peut difficilement se réaliser pour des cellules vivantes. Des recherches se sont orientées vers d'autres explications comme l'exocytose d'un "patch" qui va être appliqué sur le pore par fusion de lysosomes, l'endocytose pour internaliser le pore, la perte de la zone membranaire endommagée extracellulairement ou encore la constriction du pore [170, 267–269].

L'événement déclencheur, quelle que soit la cause de la perforation (mécanique, induite par laser) et le mécanisme de réparation, est l'influx d'ion Ca^{2+} qui entraîne des événements activant ou mobilisant des protéines permettant la réparation du cytoplasme. Que cela soit la taille des pores créés (taille des nanoparticules utilisées), leurs nombres (densité de nanoparticules), la composition du tampon du réservoir de sortie, notre dispositif de photoporation en flux peut éventuellement permettre d'explorer et moduler différents paramètres pour une meilleure compréhension de l'étape de perméabilisation que cela soit pour la formation des pores ou leur cicatrisation [270–272].

5.3 Seuil d'endommagement laser

La comparaison entre l'influence du nombre d'impulsions laser et le nombre de nanoparticules au voisinage des cellules montrent que la valeur critique de ce dernier est entre ~ 10 part./cell. et ~ 30 part./cell. où la viabilité est détériorée. Contrairement à l'augmentation de la concentration de nanoparticules qui conduit directement à la création de plus de nanopores, un nombre supérieur d'impulsion semble causer des effets sur le long terme *via* des contraintes hydrodynamiques supplémentaires : les impulsions supplémentaires génèrent un effet non pas par l'intermédiaire de nanoparticules mais *via* l'interaction avec les parois du canal.

Les perturbations observées semblent être causées par l'interaction du laser Q-switch avec le substrat en verre

qui constitue les faces d'entrée et de sortie du laser dans la puce microfluidique. La génération de plasma peut se produire dans le milieu liquide du canal ou au voisinage du verre [254, 255]. En présence d'un absorbant, le laser Q-switch génère du plasma et une onde de choc dans le substrat irradié [256]. Les émissions accompagnant ce phénomènes peuvent ainsi limiter la stabilité de l'écoulement et la viabilité des cellules. D'une part, la photoporation à distance permet d'éloigner les cellules des zones d'interactions avec le laser et ne sont exploités que les phénomènes acoustiques de sources plasmoniques. D'autre part, une profondeur de canal plus importante permettra l'atténuation de ces phénomènes et potentiellement déplacer l'optimum de perméabilisation.

L'endommagement induit par laser résulte de claquage de diélectrique ou de dénaturation thermique selon les temps et énergie caractéristiques de l'impulsions laser. Pour le pyrex, nous observons des endommagements non systématiques apparaissant entre 2 et 3 J/cm^2 (pouvant se produire après quelques secondes ou quelques heures d'illumination par le laser). Une alternative à ce matériau avec de bonnes propriétés optiques est le BK7 (borosilicate) pour lequel le seuil d'endommagement par le laser utilisé est de l'ordre de 4-5 J/cm^2. Mais son utilisation nécessite de revoir les étapes de microfabrication de la puce microfluidique (assemblage anodique avec les substrats de Si).

5.4 Adaptation d'impédance et onde de choc

L'émission de l'onde de choc est à symétrie sphérique pour les nano-bulles de vapeur générées autour des nanoparticules d'or sphériques. Une partie seulement de l'énergie portée par l'onde de choc sert à perméabiliser les cellules. La faible directivité de l'onde émise pourrait être améliorée. Considérons une onde acoustique en une dimension. Elle est caractérisée par une surpression p et une vitesse de déplacement $\vec{v}$, toutes deux dépendant de l'espace et du temps. Si l'onde se propage le long de l'axe Ox par exemple, si l'on pose $p(x,t) = f(x-ct)$, il vient :

$$\begin{cases} \dfrac{\partial p(x,t)}{\partial x} = \dfrac{\partial f(x-ct)}{\partial x} = f'(x-ct) \\ \dfrac{\partial p(x,t)}{\partial t} = \dfrac{\partial f(x-ct)}{\partial t} = -cf'(x-ct) \end{cases} \longrightarrow \frac{\partial p}{\partial x} = -\frac{1}{c}\frac{\partial p}{\partial t}$$

or

$$\frac{\partial v(x,t)}{\partial x} = -\frac{1}{\rho_0}\frac{\partial p(x,t)}{\partial x}$$

En remplaçant la dérivée spatiale de la pression par la dérivée temporelle de la vitesse, on aboutit à :

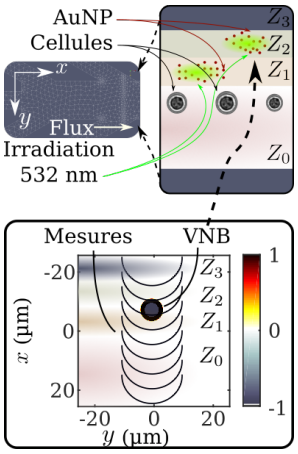
$$\frac{\partial}{\partial x}\left[v(x,t) - \frac{1}{\rho_0 c}p\right] = 0$$

En prenant $p \xrightarrow[t\to\pm\infty]{} 0$, la relation avec l'impédance acoustique donne :

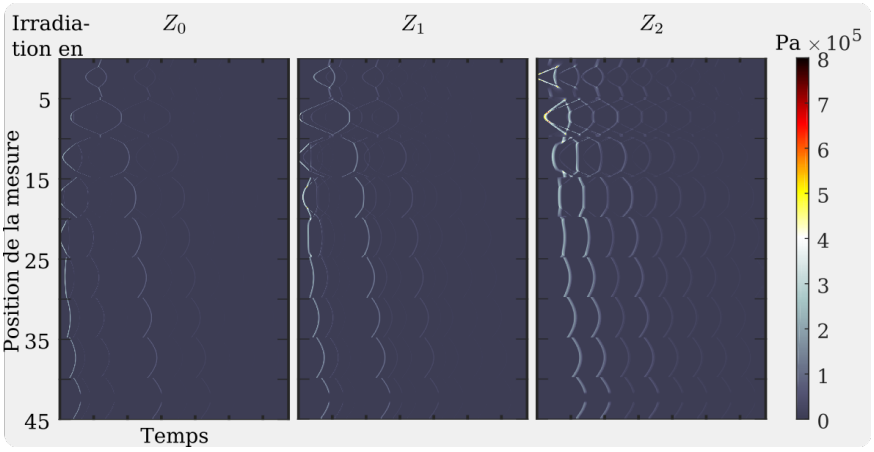
$$p = Zv \quad \text{avec } Z = \rho_0 c$$

Dans le cas d'une onde sphérique, le potentiel des vitesses vérifie l'équation de propagation suivante :

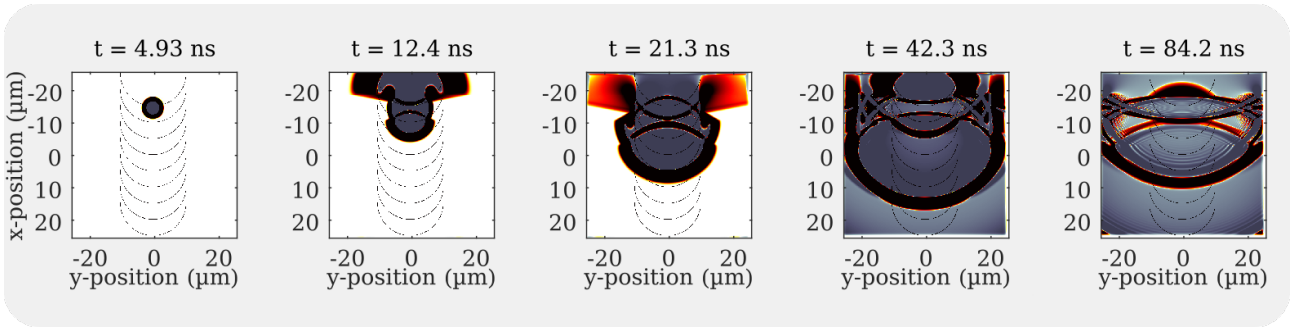
$$\frac{1}{r}\frac{\partial r\,\phi(r,t)}{\partial r} - \frac{1}{c^2}\frac{\partial^2 \phi(r,t)}{\partial t^2} = 0$$



(a) Impédance acoustique variable



(b) Onde de choc et interfaces



(c) Onde de choc et interfaces

FIGURE 6.1 – **Guide d'onde fluidique pour la photoporation en flux pour l'émission de nano-bulles de vapeur.**
Fig.a) Variation d'impédance acoustique dans un canal microfluidique. Les liquides de gaine et central sont de densités différentes. Chaque couche de liquide d'impédance acoustique Z_i peut contenir les cellules ou les nanoparticules. Une onde de choc non linéaire est émise dans chaque zone. Sa propagation est modélisée et mesurée au voisinage des cellules. **Fig.b)** Simulation qualitative d'une onde de choc ($P = 2 \cdot 10^6$Pa) générée par l'effondrement d'une nano-bulle de vapeur après excitation de la nanoparticule d'or en fonction de la position de mesure et du temps. La source se trouve dans les milieux d'impédance Z_0, Z_1 et Z_2 telles que $Z_0 \geqslant Z_1 \geqslant Z_2$. L'émission dans le milieu Z_2 et la propagation vers le milieu Z_0 (milieux de culture) est amplifiée par les réflexion. **Fig.c)** Exemple de propagation dans le cas d'une émission dans le mlieu Z_2. Les fronts d'onde sont multipliés par lles réflexions aux interfaces.

En de hors de l'origine de l'onde, la solution générale s'écrit alors :

$$\phi(r,t) = \frac{1}{r}(f_1(r-ct) + f_2(r+ct))$$

Cela permet de définir les deux grandeurs, vitesse et pression, pour définir l'impédance $Z = \overline{p(\vec{r})}/\overline{v(\vec{r})}$:

$$\begin{cases} \vec{v}(r,t) = \overrightarrow{grad}\phi(\vec{r},t) \\ p(\vec{r},t) = -\rho_0 \dfrac{\partial\phi(\vec{r},t)}{\partial t} \end{cases}$$

Cette impédance acoustique, à l'instar de l'indice optique de deux milieux, va permettre de prédire le comportement de l'onde acoustique à l'interface de deux milieux d'impédances acoustiques différentes (réflexion, réfraction...). Par exemple dans le cas d'une onde à l'interface entre les milieux (1) et (2), les énergies incidentes

et transmises vérifient :

$$E_t/E_i = \frac{4Z_1Z_2}{(Z_1+Z_2)^2}$$

Pour l'onde réfléchie :

$$E_r/E_i = \frac{(Z_2-Z_1)^2}{(Z_1+Z_2)^2}$$

Si l'on réalise un guide d'onde dans notre canal microfluidique, soit *via* les parois du canal, soit en introduisant une gaine de liquide à l'impédance acoustique différente de celle du milieu porteur des nanoparticules et des cellules. Selon l'impédance acoustique de chacun des milieux (gaine, porteur de particules ou porteur de cellules), il est possible de favoriser la réflexion à l'interface des deux premiers et la transmission à l'interface des deux derniers. L'approche ci-dessus se base sur une onde progressive. Qu'en est il dans le cas non-linéaire d'une onde de choc ? L'équation de Kuznetsov permet de décrire la propagation d'une onde de choc non linéaire dans un milieu. Il existe aussi une forme "simplifiée" de cette équation, l'équation de Westervelt, qui permet de construire les solutions d'une propagation d'onde non-linéaire par une méthode pseudo-spectrale.[273, 274]

Le phénomène de propagation d'onde de choc est à priori complexe d'autant plus au voisinage d'une interface. Mais dans le cas où l'étude des principaux paramètres (distance particule-cellule) s'avère limitée ou insatisfaisante en terme d'efficacité de photoporation, nous pouvons envisager d'introduire cette nouvelle approche "*diphasique*" pour favoriser la propagation de la contrainte mécanique et en améliorer la portée.

Considérons une configuration comme celle représentée fig 6.1a. En introduisant les différents paramètres acoustiques (densité, célérité, coefficient de Beyer et d'absorption), on peut simuler la propagation d'une onde de choc non-linéaire à partir d'une source ponctuelle dans un milieu "composé"[275]. On peut remarquer la différence de propagation selon si l'onde arrive sur la première interface ou la seconde (fig. 6.1b). Cette différence d'impédance pourrait être mise à profit de différentes manières.

La première consisterait à intégrer des lentilles acoustiques de façon à ce que l'on recrée l'effet de l'interface Huile-Silicium par exemple. En photoacoustique par exemple, des exemples de lentilles acoustiques ont largement été étudiées afin de refocaliser et améliorer la directivité du signal (matériau, géométrie...). Outre le développement de cette composante (contrainte vis-à-vis de l'onde de choc, sollicitation avec le laser, l'écoulement), l'implémentation de la lentille n'est pas triviale dans nos géométries.

Une autre approche serait de limiter la transmission et favoriser la réflexion (qualitativement fig. 6.1b et c). Ainsi, il serait possible d'introduire un liquide de gaine à l'impédance telle que l'onde transmise soit minimale. Le liquide de densité d_1 pourra être une huile bio-compatible non miscible avec l'eau de façon à l'isoler après la zone de photoporation [276]. Le but est de maintenir les ondes de chocs générées par l'excitation des nanoparticules dans la zone "utile" occupée par les cellules. Nous pourrons alors envisager certaines techniques de suivi de l'évolution de l'onde de choc, moduler les propriétés des liquides utilisés et réaliser une "adaptation d'impédance" [86, 277, 278]. À noter que la directivité de l'onde de choc dépendrait aussi de la géométrie des nanoparticules plasmoniques utilisées (rupture de symétrie, rapport d'aspect).

6 Applications en biologie et en médecine

L'usage de la microfluidique permet donc d'élargir la photoporation à différents types cellulaires en utilisant différentes sortes de nanostructures plasmoniques. Le degré de liberté supplémentaire qu'introduit la mise en

flux de l'échantillon reste le rendement de traitement qui peut facilement s'adapter à la fréquence de répétition du laser de photoporation.

Dans le cas de la méthode de photoporation en flux sans séparation la fraction positive et la viabilité obtenu dans les conditions optimisées en font un outil de transfection intéressant en recherche et en diagnostique. En effet, la présence de nanoparticules dans l'échantillon de sortie dans ces application peut ne pas être rédhibitoire. Selon la lignée cellulaire, la cytotoxicité des nanoparticules peut ne pas se manifester dans le court terme. Ces délais permettent alors d'exploiter la photoporation en flux sans séparation pour des marquages et des transfections courantes en recherche ou en diagnostique. Il est également possible de compléter ce protocole par un système de filtration inertiel ou actif à base de centrifugation ou de champ magnétique en aval du système opto-fluidique de photoporation.

Les opérations de séparation ultérieures peuvent induire un stress supplémentaire selon la lignée cellulaire. Dans ce cas, une lignée cellulaire particulière, qui peut être plus sensible au nanoparticules, requiert une séparation tout au long de la photoporation en flux qui peut être réalisée avec l'introduction du flux séparateur. D'une part, la photoporation en flux est ainsi compatible avec les lignées sensibles malgré fraction positive moins importante que la première approche. D'autre part, en introduisant un système de déclenchement adapté, la fréquence de répétition du laser n'est plus une limitation. Le protocole devient adapté à la transfection de cellules uniques et ces applications en diagnostique et thérapie. D'autant plus que l'application *in vivo* devient pertinente puisqu'il n'y a pas lieu de filtre en aval : l'échantillon est injectable sans risque de nanotoxicité à l'échelle de la cellule et/ou du patient.

Annexes

ANNEXE A

CARACTÉRISATION ET CONCEPTION DU MONTAGE OPTIQUE

1 Oscillateur Paramétrique Optique

Un oscillateur paramétrique optique se base sur la mise en cavité d'effets d'optique non-linéaire d'ordre 2. La première démonstration du dispositif a été faite en 1962 [279, 280]. Le principe est de mettre un cristal non-linéaire dans une cavité pour faire résonner un nombre d'ondes couplées dans la conversion paramétrique.
Contrairement à l'amplification stimulée exploitée dans un laser, l'amplification paramétrique est instantanée puisque le photon de pompe se scinde en un photon signal et un photon complémentaire, sans passer par un stockage d'énergie dans les différents niveaux du milieu amplificateur. Pour qu'il y ait oscillation, il faut que les pertes subies par l'onde résonnante lors de son parcours dans la cavité soient inférieures au gain paramétrique.

À partir d'une onde laser de pompe de fréquence ω_p, un O.P.O produit deux ondes de fréquences inférieures : le signal à ω_s et le complémentaire (appelé aussi idler) à ω_c. La conservation de l'énergie impose que $\omega_p = \omega_s + \omega_c$. La conversion de fréquence de la pompe vers les deux ondes générées se fait au travers d'une interaction optique non linéaire. La lumière émise par les OPO peut s'étendre de L'UV au IR lointain, de façon continue ou selon des impulsions de durées variables.

Un OPO est constitué de deux éléments :

- un milieu non linéaire à l'origine de la conversion de fréquence effectuée par l'O.P.O. Ce milieu créé un gain non-linéaire pour les ondes du signal et du complémentaire. Ce milieu est souvent un cristal comme le niobate de lithium ($LiNbO_3$).

- une cavité optique, généralement constituée de deux miroirs hautement réfléchissants de part et d'autre de l'amplificateur. C'est là où le rayonnement est oscillé et donc amplifié par passages successifs dans le milieu non linéaire.

2 Faisceau Gaussien

Mathématiquement, un faisceau gaussien se propageant selon la direction z peut être représenté par :

$$E = E_0 e^{i(kz-\omega t)} \frac{e^{ikr^2/2q}}{q} \quad avec \quad q = z - z_{\text{waist}} - iz_R \tag{1}$$

E est l'amplitude du champ électrique de l'onde et q le rayon complexe. z_{waist} est une constante réelle indiquant la position du minimum de rayon du faisceau et z_R représente la "distance de Rayleigh". En remplaçant l'expression de q, en considérant $z_{\text{waist}} = 0$, il en découle :

$$E = E_0 e^{i(kz-\omega t)} \frac{e^{ikr^2/2(z-z_{\text{waist}}-iz_R)}}{z - z_{\text{waist}} - iz_R} \tag{2}$$

$$E = E_0 e^{i(kz-\omega t)} \frac{exp\left(\frac{ikr^2}{2(z-iz_R)}\right)}{1+\frac{z^2}{z_r^2}} \left(\frac{z+iz_R}{z_R^2}\right) \tag{3}$$

Nous allons traiter le deuxième terme exponentiel :

$$\exp\left(\frac{ikr^2}{2(z-iz_R)}\right) = \exp\left(\frac{ikr^2(z+iz_R)}{2z_R^2(1+z^2/z_R^2)}\right) \tag{4}$$

$$= \exp\left(\frac{ikr^2 z}{2z_R^2(1+z^2/z_R^2)}\right) \cdot \exp\left(\frac{-kr^2 z_R)}{2z_R^2(1+z^2/z_R^2)}\right) \tag{5}$$

$$\begin{cases} k = \frac{2\pi}{\lambda} \\ \frac{\lambda z_R}{pi} = w_0^2 \end{cases} \implies = \exp\left(\frac{ir^2 z}{z_R w_0^2(1+z^2/z_R^2)}\right) \cdot \exp\left(\frac{-r^2}{w_0(1+z^2/z_R^2)}\right) \tag{6}$$

On pourra introduire :

$$\begin{cases} w(z) = w_0\sqrt{1+\frac{z^2}{z_R^2}} \\ R(z) = z + \frac{z_R^2}{z} \end{cases} \tag{7}$$

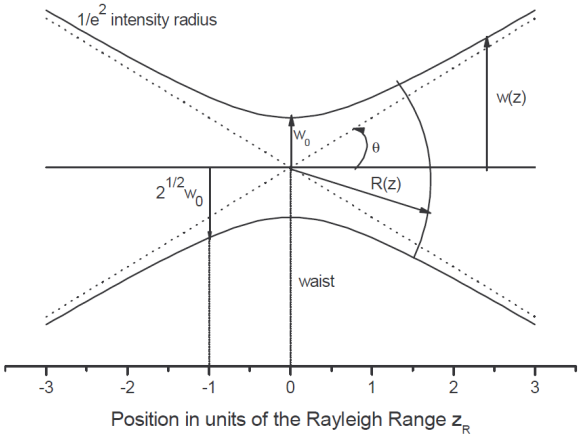


FIGURE A.1 – **Notation pour l'étude des faisceaux gaussiens.**

Par ailleurs dans l'équation 1, en posant $\tan\alpha(z) = z/z_R$, on peut réécrire :

$$E_0 \frac{1}{z - iz_R} = \frac{U_0 i}{z_R} \frac{1}{\sqrt{1 + z^2/z} \cdot e^{i\alpha(z)}} \tag{8}$$

Cela permet de réécrire l'équation 1

$$E = \frac{U_0 i}{z_R} \frac{w_0}{w(z)} e^{-i\alpha(z)} e^{i(kz - \omega t)} e^{i\frac{kr^2}{2R(z)}} e^{-r^2/w(z)^2} \tag{9}$$

Le rayon du faisceau atteint son minimum pour $z = 0$. En s'en éloignant, le faisceau diverge de façon hyperbolique. Les asymptotes définissent en champ lointain la divergence du faisceau tel que l'angle de moitié au rayon à $z = 1/e^2$ de la distribution d'intensité est donné par :

$$\theta = \lim_{z \to +\infty} \frac{w(z)}{z} = \frac{\lambda}{\pi w_0} \tag{10}$$

Au "*Beam Waist*" àz_{waist}, le front d'onde est plan et correspond à un rayon de courbure $R(z)$ infini. Loin du minimum, les fronts d'onde sont incurvés. La longueur de Rayleigh z_R est liée à la distance en deçà de laquelle le faisceau gaussien peut être collimaté avant qu'il ne diverge de $\sqrt{2}$ à cause de la diffraction. Elle permet de distinguer la région de Fresnel (champ proche) et la région de Fraunhofer (champ lointain).

Ainsi, nous pouvons caractériser ce type de faisceau par w_0 et λ. En précisant l'ordonnée z, nous pouvons donc caractériser la divergence du faisceau et donc prédire l'allure de ce dernier (fig.A.2c).

3 Calcul de la propagation du laser dans le montage optique

Il est possible, en connaissant sa valeur initiale, de calculer la variation du waist d'un faisceau laser gaussien se propageant dans un milieu. Cette étape est nécessaire pour cartographier la fluence laser tout le long du chemin optique et pour établir le profil du laser sur l'échantillon en vue de la photoporation. La fluence est calculée, à partir de l'énergie selon l'équation (9), suivant l'axe de propagation z en modélisant la propagation d'un faisceau réel à travers un milieu (air, lentille) à l'aide des matrices $ABCD$:

$$q_f(z) = \frac{A * q_i(z) + B}{C * q_i(z) + D} \quad \text{avec} \quad A,\ B,\ C \text{ et } D \text{ les éléments de la matrice du milieu de propagation } \begin{bmatrix} A & B \\ C & D \end{bmatrix}$$

et q_i et q_f respectivement les rayons complexes avant et après le milieu de propagation

tels que $\dfrac{1}{q(z)} = \dfrac{1}{R(z)} + \dfrac{i \cdot \lambda_{\text{réel}}}{\pi * \omega^2(z)}$ où $R(z)$ le rayon de courbure du front d'onde d'un faisceau gaussien

$\omega(z)$ le rayon (waist) du faisceau

$\lambda_{\text{réel}} = \lambda \cdot M^2$ la longueur d'onde corrigée pour un faisceau réel

M^2 Le facteur comparant la divergence dans le cas d'un faisceau réel et d'un faisceau gaussien

La cartographie numérique de la fluence est alors établie selon l'énergie optique injectée, le waist initial et les composants et milieux optiques traversés par le laser de photoporation (fig.2.5 Chapitre 2). Les formules ci-dessus sont implémentées numériquement pour définir les grandeurs optimales (longueur focale et puissance) afin de réaliser la photoporation par génération de nano-bulles.

Script MATLAB pour la propagation d'un faisceau réel

```
%Eval max de la fluence (I0)
fI=@(x,y,I0,wx,wy) I0*exp(-2*x.^2/wx^2).*exp(-2*y.^2/wy^2);
%Parametres de distance (focales cm)
Flj=10;%7.5;%-4;%-7.5;%10
Fac=10;
Flb=10;
%Parametres faisceau laser (cm, cm[1/e^2], mJ)
lambda=0.532e-4;
Mqf=64;%54
lambdaM=lambda*Mqf;
waist0=0.921;%0.307;%0.921
enrgmJ=50;
energy=enrgmJ*10^(-3);
strC=sprintf('Gaussian_%d-%d-%d_%d_%d_%d',Flj,Fac,floor(Flb),floor(100*waist0),enrgmJ,
    Mqf);
strE=sprintf('Elliptic_%d_%d-%d_%d_%d_%d',Flj,Fac,floor(Flb),floor(100*waist0),enrgmJ,
    Mqf);
%str=sprintf('fluence_%d-%d-%d_%d_%d',Flj,Fac,floor(Flb),floor(100*waist0),enrgmJ);

%Matrices ABCD de propagation
%Definir le domaine pour chaque segment de montage
N=100; %Param de discretisation-nbr de point par unite de longueur

L1=Flj+Fac;%3.2+3.9+12.5;
L2=Fac+Flb;%12.5;
L3=Flb;
LT=L1+L2+4*L3;
Lg1=0.1;
La1=0.01;
Lg2=0.1;

N1=floor(L1*N);
N2=L2*N;
N3=4*L3*N; %4*L3*N
Ng1=floor(50*Lg1*N);
Na1=floor(10*La1*N);
Ng2=floor(50*Lg2*N);

%Pour matrice de transfert en milieu libre
z1=linspace(0,L1,N1);
z2=linspace(0,L2,N2);
z3=linspace(0,4*L3,N3);

%Axe de propagation
z1p=linspace(0,L1,N1);
z2p=linspace(L1,L1+L2,N2);
z3p=linspace(L1+L2,L1+L2+4*L3,N3);
```

```
46
47 Zp=linspace(0,L1+L2+4*L3,N1+N2+N3);
48
49 %Propagation libre%figure; plot(z1p,w0c,'k'); hold on; plot(z2p,w1c,'r'); plot(z3p,w2c
       ,'g'); hold off
50 T1=zeros(2,2,N1);T2=zeros(2,2,N2);T3=zeros(2,2,N3);
51 for k1=1:N1
52   T1(:,:,k1)=[1 z1(k1);0 1];
53 end
54 for k2=1:N2
55   T2(:,:,k2)=[1 z2(k2);0 1];
56 end
57 for k3=1:N3
58   T3(:,:,k3)=[1 z3(k3);0 1];
59 end
60
61 %Propagation dans le systeme verre-canal-verre
62 zg1=linspace(0,Lg1,Ng1);
63 za1=linspace(0,La1,Na1);
64 zg3=linspace(0,Lg2,Ng2);
65
66 zg1p=linspace(0,Lg1,Ng1);
67 za1p=linspace(Lg1,Lg1+La1,Na1);
68 zg2p=linspace(Lg1+La1,Lg1+La1+Lg2,Ng2);
69
70 Tg1=zeros(2,2,Ng1);Ta1=zeros(2,2,Na1);Tg2=zeros(2,2,Ng2);
71 T01=zeros(2,2,Ng1);T02=zeros(2,2,Ng2);
72 for kg1=1:Ng1
73   Tg1(:,:,kg1)=[1 zg1(kg1)/1.474;0 1];
74   T01(:,:,kg1)=[1 zg1(kg1);0 1];
75 end
76 for ka1=1:Na1
77   Ta1(:,:,ka1)=[1 za1(ka1);0 1];
78 end
79 for kg2=1:Ng2
80   Tg2(:,:,kg2)=[1 zg3(kg2)/1.474;0 1];
81   T02(:,:,kg2)=[1 zg3(kg2);0 1];
82 end
83
84 %Propagation au travers d'une lentille
85 Mlj=[1 0; -1/Flj 1];
86 %Mlj=[1 0;0 1];
87 Mac=[1 0; -1/Fac 1];
88 Mlb=[1 0; -1/Flb 1];
89 %Matrice pour gaussien sur echantillon (definition globale)
90 Mg = T3(:,:,N3)*Mlb*T2(:,:,N2)*Mac*T1(:,:,N1);
91 %Matrice pour elliptique sur echantillon (defintion globale)
92 Mex= T3(:,:,N3)*Mlb*T2(:,:,N2)*Mac*T1(:,:,N1);%*Mlj;
93 Mey= T3(:,:,N3)*Mlb*T2(:,:,N2)*Mac*T1(:,:,N1)*Mlj;
```

```
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%

%% MatGlob
%%En calculant avec la matrice composee pour tout le milieu de propagation
%Faisceau circulaire (gaussien)
qi0c=1./(-1i*lambdaM./(pi*waist0^2));
Qf0c=[];
for k1=1:N1
        A = T1(:,:,k1);%*Mlj;
        a=A(1,1);b=A(1,2);c=A(2,1);d=A(2,2);
        qf0c=(a*qi0c + b)./(c*qi0c + d);
        Qf0c=[Qf0c; qf0c];
end
w0c=(-lambdaM./(pi*imag(1./Qf0c))).^0.5;
Qf1c=[];
for k2=1:N2
        A = T2(:,:,k2)*Mac*T1(:,:,N1);%*Mlj;
        a=A(1,1);b=A(1,2);c=A(2,1);d=A(2,2);
        qf1c=(a*qi0c + b)./(c*qi0c + d);
        Qf1c=[Qf1c; qf1c];
end
w1c=(-lambdaM./(pi*imag(1./Qf1c))).^0.5;
Qf2c=[];
for k3=1:N3
        A = T3(:,:,k3)*Mlb*T2(:,:,N2)*Mac*T1(:,:,N1);%*Mlj;
        a=A(1,1);b=A(1,2);c=A(2,1);d=A(2,2);
        qf2c=(a*qi0c + b)./(c*qi0c + d);
        Qf2c=[Qf2c; qf2c];
end
w2c=(-lambdaM./(pi*imag(1./Qf2c))).^0.5;

%Faisceau elliptique (cylindrique)
qi0e=1./(-1i*lambdaM./(pi*waist0^2));
Qf0e=[];
for k1=1:N1
        A = T1(:,:,k1)*Mlj;
        a=A(1,1);b=A(1,2);c=A(2,1);d=A(2,2);
        qf0e=(a*qi0e + b)./(c*qi0e + d);
        Qf0e=[Qf0e; qf0e];
end
w0e=(-lambdaM./(pi*imag(1./Qf0e))).^0.5;
Qf1e=[];
for k2=1:N2
        A = T2(:,:,k2)*Mac*T1(:,:,N1)*Mlj;
        a=A(1,1);b=A(1,2);c=A(2,1);d=A(2,2);
        qf1e=(a*qi0e + b)./(c*qi0e + d);
        Qf1e=[Qf1e; qf1e];
end
w1e=(-lambdaM./(pi*imag(1./Qf1e))).^0.5;
```

```
Qf2e=[];
for k3=1:N3
        A = T3(:,:,k3)*Mlb*T2(:,:,N2)*Mac*T1(:,:,N1)*Mlj;
        a=A(1,1);b=A(1,2);c=A(2,1);d=A(2,2);
        qf2e=(a*qi0e + b)./(c*qi0e + d);
        Qf2e=[Qf2e; qf2e];
end
w2e=(-lambdaM./(pi*imag(1./Qf2e))).^0.5;
%
%figure; plot(z1p,w0c,'k'); hold on; plot(z2p,w1c,'r'); plot(z3p,w2c,'g'); hold off
%figure; plot(z1p,w0e,'k'); hold on; plot(z2p,w1e,'r'); plot(z3p,w2e,'g'); hold off

Wc=[w0c;w1c;w2c];
M=2*max(Wc);
Nw=floor(10000*M);%figure; plot(z1p,w0c,'k'); hold on; plot(z2p,w1c,'r'); plot(z3p,w2c
    ,'g'); hold off
Wrc=linspace(-M,M,Nw);

Wex=[w0c;w1c;w2c];
Wey=[w0e;w1e;w2e];
I0e=4*energy./(2*pi*Wex.*Wey);
Mx=2*max(Wex);My=2*max(Wey);
Nwx=floor(10000*Mx);
Nwy=floor(10000*My);
Wrex=linspace(-Mx,Mx,Nwx);
Wrey=linspace(-My,My,Nwy);

[I1cx,I1cy]=fluenceZ(energy,w0c,w0c,N1,fI,Nw,Nw);
[I2cx,I2cy]=fluenceZ(energy,w1c,w1c,N2,fI,Nw,Nw);
[I3cx,I3cy]=fluenceZ(energy,w2c,w2c,N3,fI,Nw,Nw);

[I1ex,I1ey]=fluenceZ(energy,w0c,w0e,N1,fI,Nwx,Nwy);
[I2ex,I2ey]=fluenceZ(energy,w1c,w1e,N2,fI,Nwx,Nwy);
[I3ex,I3ey]=fluenceZ(energy,w2c,w2e,N3,fI,Nwx,Nwy);
%
%%% Considering_{Glass-Channel-Glass}
% Qfg1=[];
% for kg1=1:Ng1
%       A = Tg1(:,:,kg1)*T3(:,:,floor(N3/4-16))*Mlb*T2(:,:,N2)*Mac*T1(:,:,N1)*Mlj;
%       a=A(1,1);b=A(1,2);c=A(2,1);d=A(2,2);
%       qfg1=(a*qi0e + b)./(c*qi0e + d);
%       Qfg1=[Qfg1; qfg1];
% end
% wg1=(-lambdaM./(pi*imag(1./Qfg1))).^0.5;
% Qfa1=[];
% for ka1=1:Na1
%       A = Ta1(:,:,ka1)*Tg1(:,:,Ng1)*T3(:,:,floor(N3/4-16))*Mlb*T2(:,:,N2)*Mac*T1(:,:,
    N1)*Mlj;
%       a=A(1,1);b=A(1,2);c=A(2,1);d=A(2,2);
```

```
%         qfa1=(a*qi0e + b)./(c*qi0e + d);
%         Qfa1=[Qfa1; qfa1];
% end
% wa1=(-lambdaM./(pi*imag(1./Qfa1))).^0.5;
% Qfg2=[];
% for kg2=1:Ng2
%         A = Tg2(:,:,kg2)*Ta1(:,:,Na1)*Tg1(:,:,Ng1)*T3(:,:,floor(N3/4-16))*Mlb*T2(:,:,N2)*Mac*T1(:,:,N1)*Mlj;
%         a=A(1,1);b=A(1,2);c=A(2,1);d=A(2,2);
%         qfg2=(a*qi0e + b)./(c*qi0e + d);
%         Qfg2=[Qfg2; qfg2];
% end
% wg2=(-lambdaM./(pi*imag(1./Qfg2))).^0.5;
%
% %figure; plot(zg1p,wg1,'k'); hold on; plot(za1p,wa1,'r'); plot(zg2p,wg2,'g');
% Wgag=[wg1;wa1;wg2];
% Mg=2*max(Wgag);
% Wrg=linspace(-Mg,Mg,Nw);
%
% %%Comparing_{Air-Air-Air}
% Qf01=[];
% for kg1=1:Ng1
%         A = T01(:,:,kg1)*T3(:,:,floor(N3/4-16))*Mlb*T2(:,:,N2)*Mac*T1(:,:,N1)*Mlj;
%         a=A(1,1);b=A(1,2);c=A(2,1);d=A(2,2);
%         qf01=(a*qi0e + b)./(c*qi0e + d);
%         Qf01=[Qf01; qf01];
% end
% w01=(-lambdaM./(pi*imag(1./Qf01))).^0.5;
% Qfa01=[];
% for ka1=1:Na1
%         A = Ta1(:,:,ka1)*T01(:,:,Ng1)*T3(:,:,floor(N3/4-16))*Mlb*T2(:,:,N2)*Mac*T1(:,:,N1)*Mlj;
%         a=A(1,1);b=A(1,2);c=A(2,1);d=A(2,2);
%         qfa01=(a*qi0e + b)./(c*qi0e + d);
%         Qfa01=[Qfa01; qfa01];
% end
% wa01=(-lambdaM./(pi*imag(1./Qfa01))).^0.5;
% Qf02=[];
% for kg2=1:Ng2
%         A = T02(:,:,kg2)*Ta1(:,:,Na1)*T01(:,:,Ng1)*T3(:,:,floor(N3/4-16))*Mlb*T2(:,:,N2)*Mac*T1(:,:,N1)*Mlj;
%         a=A(1,1);b=A(1,2);c=A(2,1);d=A(2,2);
%         qf02=(a*qi0e + b)./(c*qi0e + d);
%         Qf02=[Qf02; qf02];
% end
% w02=(-lambdaM./(pi*imag(1./Qf02))).^0.5;
% %%
%
% figure;plot(zg1p,wg1,'k');hold on; plot(za1p,wa1,'r'); plot(zg2p,wg2,'g');
```

```
% plot(zg1p,w01,'.-');plot(za1p,wa01,'+'); plot(zg2p,w02,'--'); hold off
%


% Plot_Output
str=sprintf('Waist f:%d-f:%d-f:%d-w:%d-e:%d-M2:%d on chip',Flj,Fac,floor(Flb),floor(100*waist0),enrgmJ,Mqf);
strS=sprintf('f%d-f%d-f%d-w%d-e%d-W-50um-M2%d',Flj,Fac,floor(Flb),floor(100*waist0),enrgmJ,Mqf);
f2=figure('visible','on','Name',str,'Units','normalized','Position',[0 0 1 1]);
subplot(4,1,1);
imagesc([z1p z2p z3p]',Wrex,[I1ex;I2ex;I3ex]');colorbar(); view(-360,-90);hold on;
plot(Zp,Wex,'w',Zp,-Wex,'w');% hold off;
axis([0 inf -Mx Mx]);
title('Beam projection along x.')% Colormap in (J/cm^2)')
xlabel('Axis of propagation z (cm)');
ylabel('Transverse X axis (cm)');
subplot(4,1,2);
imagesc([z1p z2p z3p]',Wrey,[I1ey;I2ey;I3ey]');colorbar(); view(-360,-90);hold on;
plot(Zp,Wey,'w',Zp,-Wey,'w');% hold off;
axis([0 inf -My My]);
title('Beam projection along y.')% Colormap in (J/cm^2)')
xlabel('Axis of propagation z (cm)');
ylabel('Transverse Y axis (cm)');
subplot(4,1,3);
%k=0;
%j2=find(abs(w2e-0.0042)<=2e-4)
%j2=max(j2)
%k=k+1;
j2=find(w2e==min(w2e));
wx50=w2c(j2);
wy50=w2e(j2);
fwhmx=wx50*(2*log(2))^0.5;
fwhmy=wy50*(2*log(2))^0.5;
nx=floor(10000*wx50);
ny=floor(10000*wy50);
i0e=2*energy/(pi*wx50*wy50);
rngx=linspace(-fwhmx/2,fwhmx/2,nx);
rngx0=linspace(-0.2,0.2,nx);
rngy=linspace(-fwhmy/2,fwhmy/2,ny);
[xx,yy]=meshgrid(rngx,rngy);
Ixy=fI(xx,yy,i0e,wx50,wy50);
surf(xx,yy,Ixy); shading interp; title('Fluence on chip FWHM');
colorbar();
%axis('xy','equal');
xlabel('Channel axis (along the flow) (cm)');
ylabel('Transverse Y axis (cm)');
%hold on; plot(rngx0,-0.0400*ones(1,nx),rngx0,0.0400*ones(1,nx));
view(180,-90); %hold off;
subplot(4,1,4);
```

```
%jf=find(w2e==min(w2e));
wx=w2c(j2);
wy=w2e(j2);
rngxe=linspace(-wx,wx,nx);
rngx0=linspace(-0.2,0.2,nx);
rngye=linspace(-wy,wy,ny);
[xxe,yye]=meshgrid(rngxe,rngye);
Ixye=fI(xxe,yye,i0e,wx,wy);
surf(xxe,yye,Ixye); shading interp; title('Fluence on chip 1/e^2');
colorbar();
axis('xy','equal');
xlabel('Channel axis (along the flow) (cm)');
ylabel('Transverse Y axis (cm)');
%hold on; plot(rngx0,-0.0400*ones(1,nx),rngx0,0.0400*ones(1,nx));
view(180,-90);% hold off;
```

La détermination du waist initial, ou en sortie de pompe optique se fait expérimentalement en mesurant la puissance optique à l'aide d'une lame de rasoir en translation.

4 Mesure par la méthode de la lame

Il s'agit d'obstruer le laser de $-\infty$ à respectivement x et y en deux positions Z du faisceau ($\Delta Z = 50$ cm) et mesurer la puissance optique totale récupérée *via* une tête de puissance (fig.A.2a). Nous pouvons ainsi déterminer le profil du rayon et grâce à la divergence, prédire son comportement en aval d'un système optique (lentille, dichroïque, miroir...).

Soit un faisceau se propageant le long de l'axe z avec un profil d'intensité gaussien :

$$I(x,y) = I_0 e^{-2x^2/w_x^2} e^{-2y^2/w_y^2} \tag{11}$$

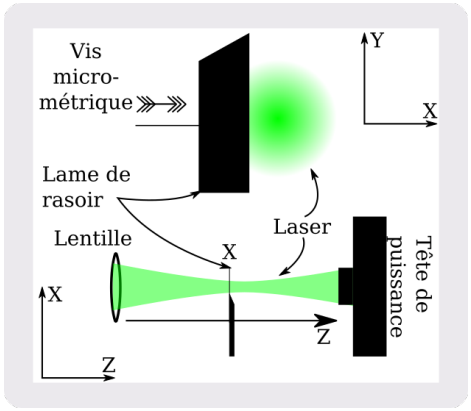
avec w_i les rayons à $1/e^2$ pour $i \in x, y$ et I_0 le module de l'intensité. Par ailleurs, la puissance totale est :

$$\begin{aligned} P_{Total} &= I_0 \iint e^{-2x^2/w_x^2} e^{-2y^2/w_y^2} dxdy \\ &= I_0 \int_{-\infty}^{+\infty} e^{-2x^2/w_x^2} dx \int_{-\infty}^{+\infty} e^{-2y^2/w_y^2} dy \\ &= I_0 \sqrt{\frac{\pi}{2}} w_x \sqrt{\frac{\pi}{2}} w_y = \frac{\pi}{2} I_0 w_x w_y \end{aligned} \tag{12}$$

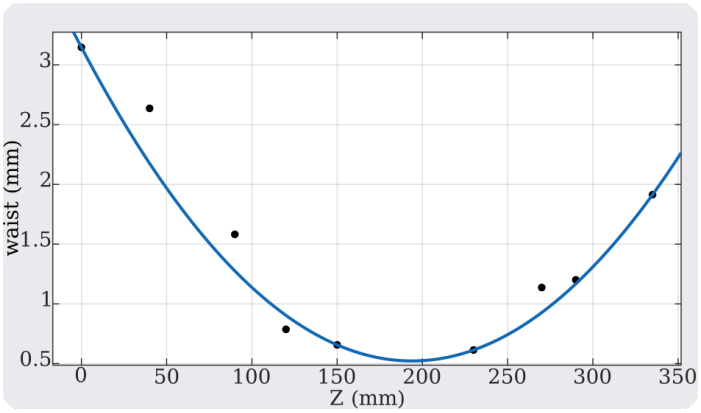
Dans le cas d'obstruction par une lame, la puissance transmise à l'énergie-mètre s'écrit :

$$P(X) = P_{\text{Total}} - P_C \tag{13}$$

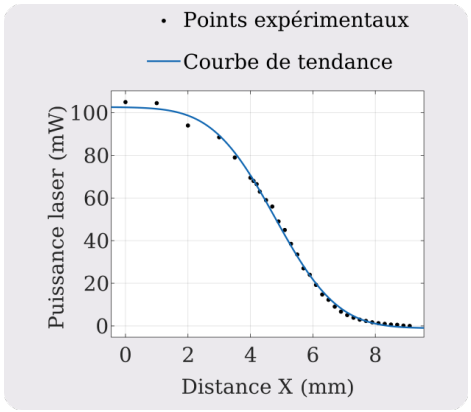
$$P(X) = P_{Total} - I_0 \int_{-\infty}^{X} e^{-2x^2/w_x^2} dx \underbrace{\int_{-\infty}^{+\infty} e^{-2y^2/w_y^2} dy}_{\text{Intég. Gauss}}$$



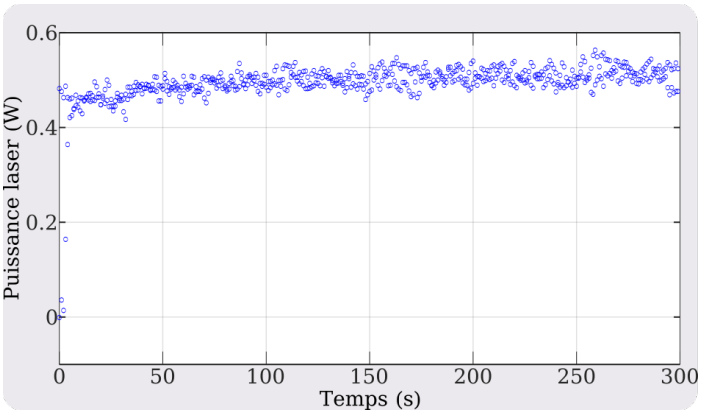
(a) Mesure du profil transverse



(c) Divergence du faisceau post lentille



(b) Profil du faisceau



(d) Fluctuation de la puissance optique injectée

FIGURE A.2 – **Caractéristiques de la source laser pour la photoporation.**
Fig.A.2a) Mesure du rayon du faisceau en sortie de pompe en utilisant une lame de rasoir. On place une tête de puissance sur le chemin optique. Sur une vis micrométrique, une lame de rasoir est placée de façon à venir écranter progressivement le faisceau de la tête de puissance. La puissance mesurée tout au long de la translation de la lame peut être approchée par une fonction erreur erf dépendant du maximum de puissance (lame complètement rétractée) et du rayon du faisceau. **Fig.A.2b)** Mesure de la puissance reçue par le détecteur en fonction de la position de la lame de rasoir. La courbe est approchée par l'expression (15) et renvoie $w_{1/e^2} \sim 3.1$ mm. **Fig.A.2c)** Divergence du faisceau laser à partir de différentes mesures de waist suivant l'axe de propagation. **Fig.A.2d)** Mesure de la puissance optique dans le temps. On observe un temps de stabilisation et des fluctuations de l'ordre de $\pm 2\%$ (l'écart-type entre les impulsions est de l'ordre de 7 mW pour une puissance moyenne de ~ 450 mW.

$$
\begin{aligned}
&= P_{Total} - I_0 \sqrt{\frac{\pi}{2}} w_y \int_{-\infty}^{X} e^{-2x^2/w_x^2} dx \\
&= P_{Total} - I_0 \sqrt{\frac{\pi}{2}} w_y \left[\int_{-\infty}^{0} e^{-2x^2/w_x^2} dx + \int_{0}^{X} e^{-2x^2/w_x^2} dx \right] \\
&= P_{Total} - I_0 \sqrt{\frac{\pi}{2}} w_y \left[\sqrt{\frac{\pi}{8}} w_x + \int_{0}^{X} e^{-2x^2/w_x^2} dx \right] \\
&= P_{Total} - \frac{P_{Total}}{2} - I_0 \sqrt{\frac{\pi}{2}} w_y \int_{0}^{X} e^{-2x^2/w_x^2} dx \\
&= \frac{P_{Total}}{2} - I_0 \sqrt{\frac{\pi}{2}} w_y \int_{0}^{X} e^{-2x^2/w_x^2} dx
\end{aligned}
\tag{14}
$$

À partir de ce dernier résultat (éq. 14) et à l'aide d'un changement de variable tel que $u^2 = 2x^2/w_x^2$, il vient :

$$\begin{aligned} P(X) &= \frac{P_{Total}}{2} - I_0\sqrt{\frac{\pi}{2}}w_y \int_0^{\frac{\sqrt{2}X}{w_x}} e^{-u^2}\frac{w_x}{\sqrt{2}}du \\ &= \frac{P_{Total}}{2} - I_0\frac{\pi}{4}w_x w_y \underbrace{\frac{2}{\sqrt{\pi}}\int_0^{\frac{\sqrt{2}X}{w_x}} e^{-u^2}du}_{\text{Fct. erreur}} \\ &= \frac{P_{Total}}{2}\left[1 - erf\left(\frac{\sqrt{2}X}{w_x}\right)\right] \end{aligned} \tag{15}$$

Cette expression convient à la courbe de puissance mesurée et permet d'extraire la valeur du waist w_x (fig.A.2b).

À chaque position sur l'axe de propagation et pour chaque incrément de distance pour le décalage de la lame de rasoir, la puissance est mesuré pendant 10 s. Le taux de répétition du laser de photoporation de 10 Hz implique que 100 impulsions sont alors reçues par la tête de puissance. La mesure des valeurs de la puissance à la fréquence de répétition indique un temps d'établissement de quelques minutes après ouverture de la cavité. Sur ces mesures, l'écart-type vaut ~ 20 mW pour une moyenne de 450 mW mesurée pendant ce régime transitoire. Pour des mesures durant 10 min après établissement du régime permanent, l'écart-type entre les impulsions est de l'ordre de 7 mW pour la même puissance moyenne (fig.A.2d).

ANNEXE B

SYSTÈME D'IMAGERIE

1 Microscopie en fluorescence

L'analyse des résultats de photoporation de cellules adhérentes ou en flux sont fait grâce à l'imagerie en fluorescence des cellules traitées. Le dispositif de microscopie consiste en un microscope inversé Nikon Ti2000. Son bloc de fluorescence (filtre d'émission et d'excitation ainsi que l'aide) a été adapté aux différents fluorochromes. Les images sont renvoyées sur le capteur CMOS d'une caméra HAMAMATSU orcaflash 40. L'échantillon est déposé sur une platine ASI MS2000 permettant la translation dans le plan focal de l'objectif. La position de ce dernier est contrôlée par le microscope. Tous ces éléments sont interfacés à un ordinateur par LabVIEW pour l'excitation de la fluorescence, la mise au point et l'acquisition d'images et la translation de la platine.

2 Système de mise au point

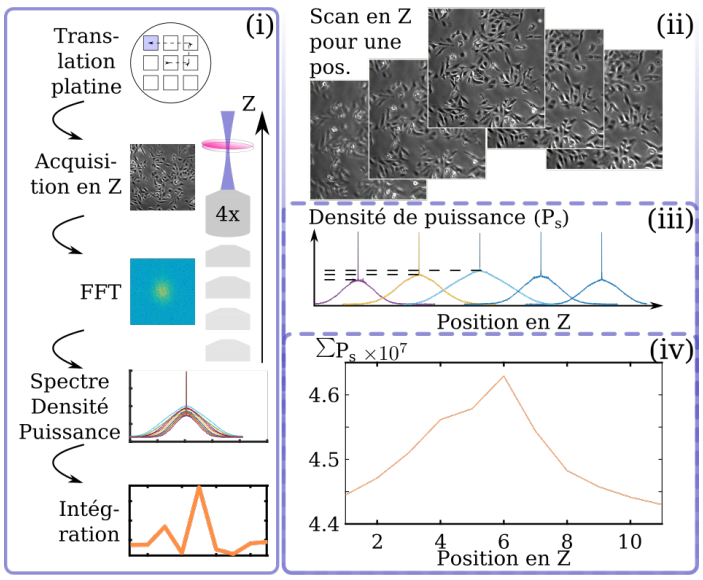
La mise au point est nécessaire d'une part pour l'étape d'analyse d'images et de segmentation pour la détection des cellules. D'autre part, elle permet une meilleure quantification de la fluorescence. Deux stratégies sont mises en oeuvre selon l'objectif utilisé pour garantir l'acquisition d'images mises au point : le z-stack et le PFS.

Images prises avec le 4x

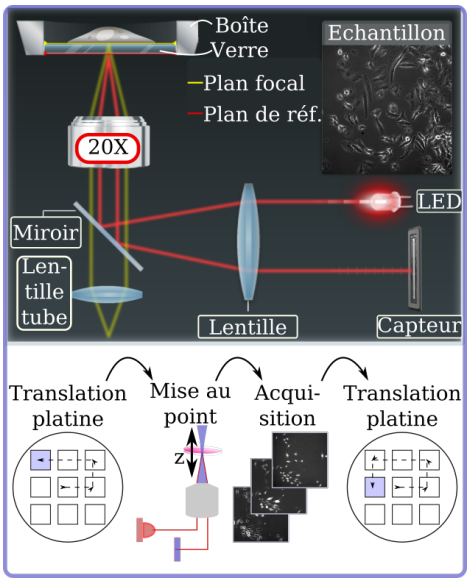
Un objectif Nikon PlanFluor 4x est utilisé pour une évaluation rapide du nombre de cellules et de leur fluorescence. Avec son champ de 3.3×3.3 mm^2, la zone d'intérêt est acquise en quelques images (9 positions ≈ 0.9 cm^2 du fond de verre ou de la chambre de visualisation) en quelques minutes (≈ 5 min). Pour s'assurer que chaque position soit mise au point pendant la prise d'image, un balayage vertical enregistre des images par incrément de 50 µm de hauteur d'objectif (graphique ***(i)*** et ***(ii)*** fig.B.1a). Doté d'un anneau de contraste de phase, il permet d'obtenir des images en lumières blanches de contraste élevé.

Pour une image donnée, le spectre de densité de puissance obtenu par transformée de Fourier rapide caractérise son domaine fréquentiel. Si cette image perd en netteté, les composantes haute-fréquence du spectre perdent en amplitude. Sur les séries "z-stack" (graphique ***(iii)*** fig. B.1a), nous allons donc chercher l'image passant par un maximum de la quantité :

$$PsD = |fftshift(fft2(M))|^2;$$



(a) Utilisation du "z-stack" pour l'objectif 4x



(b) Utilisation du PFS pour l'objectif 20x

FIGURE B.1 – **Prise d'image par Microscopie en fluorescence des échantillons : Imagerie en lumière blanche et fluorescence des échantillons.**
Rappelons que deux types d'images sont prises. Avec la largeur de champ du 4x, il est possible avec 9 images de reconstituer 1cm^2 de l'échantillon et d'évaluer le nombre de cellules. Pour garantir des images mises au point en lumière blanche ou en fluorescence, chaque position est balayée suivant l'axe optique. Avec la focalisation du 20x, l'intensité de la lumière d'excitation est plus importante et permet d'avoir des signaux d'émission sur une gamme dynamique plus étendue. **Fig.B.1a)** Le diagramme ***(i)*** contient les différentes étapes d'acquisition et de traitement des images obtenues avec l'objectif 4x en contraste de phase. Après la translation de l'échantillon, une série d'images est prise à différentes hauteurs d'objectif et l'image la plus nette est déterminée par le spectre de densité de puissance obtenu par transformée de Fourier rapide en deux dimensions. L'intégration du spectre (sommation pixel à pixel) est ensuite tracé en fonction de position pour en extraire le maximum. Le schéma ***(ii)*** représente cinq des onze images généralement prises avec un incrément de 50 µm. Le graphique ***(iii)*** rassemble les spectres de densité de puissances moyennés dans une direction de l'image pour chacune des images du schéma ***(iii)***. On remarque que l'image la plus nette correspond au maximum. Le graphique ***(iv)*** contient la courbe des valeurs sommées de chaque courbe en fonction de la position de l'image sur l'axe Z. La position $n°6$ est la position la plus proche du plan focal, de l'image la plus nette. **Fig.B.1b)** Le Perfect Focus System (PFS) du fabricant Nikon exploite la réflexion d'un faisceau infra-rouge à l'interface entre le fond de verre et le milieu aqueux de l'échantillon. Cette référence est utilisée pour corriger les différences de positions sur l'axe Z.

où $fft2(M)$ est la transformée de Fourier rapide en deux dimensions de l'image M de taille $m \times n$ telle que :

$$Y_{p+1,q+1} = \sum_{j=0}^{m-1} \sum_{k=0}^{n-1} \omega_m^{jp} \omega_n^{kq} X_{j+1,k+1}$$

avec $\omega_m = e^{-2i\pi/m}$ et $\omega_n = e^{-2i\pi/n}$ les racines complexes de l'unité et p et q des entiers dans $[0 : m-1]$ et $[0 : n-1]$ respectivement. La commande $fftshift$ introduit un décalage de fréquence pour centrer la composante de fréquence nulle.

Les images ainsi dégagées de tous les canaux sont répertoriées pour ensuite être prises en arguments dans les différentes scripts d'analyse.

Script MATLAB pour détection de l'image au plan focal

```
1 % Start with a folder and get a list of all subfolders.
```

```
% Finds and prints names of textfiles that folder and all of its subfolders.
% workspace;  % Make sure the workspace panel is showing.
format longg;
format compact;

%% Extract_Dir_fold

% Define a starting folder.
start_path_input = fullfile('~/MIC_DATA/tlmic_left/2019/');
start_path_output = fullfile('~/Documents/ANALYSE_temp/');
% Ask user to confirm or change.
topLevelFolder = uigetdir(start_path_input);
dwnLevelFolder = uigetdir(start_path_output);
if topLevelFolder == 0
    return;
end
% Get list of all subfolders.
allSubFolders = genpath(topLevelFolder);
% Parse into a cell array.
remain = allSubFolders;
listOfFolderNames = {};
while true
    [singleSubFolder, remain] = strtok(remain, ':');
    if isempty(singleSubFolder)
        break;
    end
    listOfFolderNames = [listOfFolderNames, singleSubFolder];
end

% Extracting the 4X folder (J1)
ismatch4b = ~cellfun(@isempty, regexp(listOfFolderNames, 'J\d[r,p,q]','match','once'));
listOf4Xfoldb = listOfFolderNames(not(ismatch4b));
ismatch4c = ~cellfun(@isempty, regexp(listOf4Xfoldb, 'J\dq','match','once'));
listOf4Xfoldc = listOf4Xfoldb(not(ismatch4c));
ismatch4d = ~cellfun(@isempty, regexp(listOf4Xfoldc, 'J\dt','match','once'));
listOf4Xfoldd = listOf4Xfoldc(not(ismatch4d));
ismatch4e = ~cellfun(@isempty, regexp(listOf4Xfoldd, 'J\du','match','once'));
listOf4Xfolde = listOf4Xfoldd(ismatch4e);


ismatch4 = ~cellfun(@isempty, regexp(listOf4Xfoldb, 'Pfx','match','once'));
listOf4Xfold = listOf4Xfoldb(ismatch4);


% Initiating Output Structure
StrcFoc=struct([]);


%% Extract_Chanel1
```

```
% FITC-GFP Stain
ismatch2 = ~cellfun(@isempty, regexp(listOf4Xfold, 'chanel2',...
    'match', 'once'));
listOfChanFold2 = listOf4Xfold(ismatch2);
numberOfFolders2 = length(listOfChanFold2);

for j=1:numberOfFolders2
    thisFolder = listOfChanFold2{j};
    fprintf('Processing folder %s\n', thisFolder);

    UndSC = regexp(thisFolder,'_');
    BckSL = regexp(thisFolder,'/');

    filePattern = sprintf('%s/image*.tif', thisFolder);
    baseFileName = dir(filePattern);
    numberOfImStck = length(baseFileName);

    SumP = [];

    %Spectre de densite de puissance des stack en Hoescht
    for k= 1:numberOfImStck
        imgName = fullfile(thisFolder,baseFileName(k).name);
        fprintf('            Processing image file %s\n', imgName);
        imgStck = uint16(imread(imgName));

        PsD = log10(abs(fftshift(fft2(imgStck))).^2);
        SumP=[SumP,sum(PsD(:))];
    end

    %On recupere le numero fichier focus
    maindir = thisFolder(1:end-18);
    maindr2 = strcat(dwnLevelFolder,thisFolder(BckSL(end-3):BckSL(end-1)));
    StrcFoc(j).MainDir = maindir;
    chantyp = thisFolder(end-6:end);
    StrcFoc(j).ChanNum2 = chantyp;
    pos0000 = thisFolder(end-16:end-8);
    StrcFoc(j).PosStck = pos0000;
    kfocflg = find(SumP==max(SumP));
    StrcFoc(j).KFcsFlg2 = kfocflg;
    focimgs = baseFileName(kfocflg).name;
    StrcFoc(j).FileNme2 = focimgs;
    ffnfocI = strcat('Focus_',chantyp,'/',chantyp,'_Focus_',...
        StrcFoc(j).PosStck,'.tif');
    StrcFoc(j).FulfDes2 = fullfile(maindr2,ffnfocI);
end
```

Images prises avec le 20x

Le microscope utilisé pour l'imagerie est doté d'un système d'autofocus permettant d'ajuster la mise au point

à chaque position de l'échantillon. Il est notamment compatible avec l'objectif Nikon S-Plan Fluor 20x. Avec son champ réduit (0.67×0.67 mm^2) et sa focalisation de la lumière d'excitation, l'objectif 20x avec une ouverture numérique de 0.7 permet de meilleures résolutions spatiales et de niveaux de gris. 289 positions (≈ 1.2 cm^2) sont balayées, mises au point en temps réel avec le système d'autofocus du microscope, pour couvrir la majeur partie de l'échantillon. Pour réduire la mémoire de stokage, la technique du z-stack est remplacée par l'utilisation du Perfect Focus System (PFS) du fabricant Nikon, compatible avec l'objectif utilisé.

À l'aide d'une LED infrarouge, un rayon est envoyé sur l'échantillon à travers l'objectif. Un changement d'indice existe entre la couche de verre qui constitue le fond de la boîte de culture et la milieu aqueux de l'échantillon (milieu de culture, cellules). Il crée une réflexion qui est captée sur une matrice CCD et gardée en mémoire comme référence de la distance objectif échantillon. Le PFS, ensuite, conserve automatiquement et de façon continue la mise au point au moyen d'un encodeur linéaire intégré et d'un mécanisme de rétroaction à haute vitesse. Il effectue à partir de là les corrections pour correspondre au signal de référence sur le capteur pour les différentes longueurs d'onde telles que la lumière blanche ou les émission de fluorescence (fig. B.1b). On s'affranchie ainsi du stokage et du post-traitement pour déterminer les images mises au point de tous les canaux.

ANNEXE C

EXPLOITATION DES IMAGES DE MICROSCOPIE

1 Post-traitement de l'échantillon en vue de l'imagerie

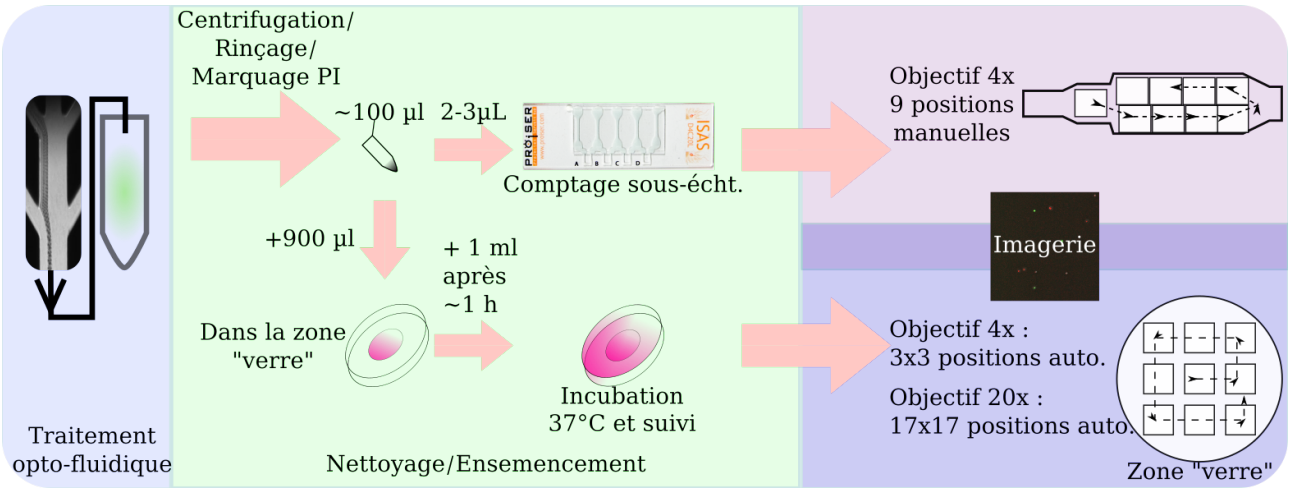


FIGURE C.1 – **Préparation des échantillon après le traitement opto-fluidique pour l'imagerie.** Après l'écoulement en puce microfluidique, avec ou sans irradiation, l'échantillon de cellules et centrifugé et rincé avec du DPBS(- - -) pour éliminer surnageant et FITC-Dextran non incorporé. 2 à 3 µl du culot cellulaire récupéré ($\sim$ 100 µl) sans placé dans les chambre de visualisation pour estimer les performances de la photoporation $\sim 1-2$ h après traitement (J0). Les chambres remplies de la suspension de cellules sont imagées avec l'objectif 4x en couvrant 9 positions définies manuellement. Le reste du culot est resuspendu dans 500 µl de DMEM(+ + +) dans un premier temps et placé dans la zone de fond de verre d'une boîte de culture de 35 mm (D35). De cette manière toute les cellules sont susceptibles d'adhérer dans la zone qui sera imagée. Dans un deuxième temps, le volume occupant cette zone est complété à $\sim$ 1 ml et la boîte de culture est mise en incubateur. Après 1 h, 1 ml est ajouté afin de compléter le milieu de culture pour la suite du suivi.

Le premier échantillon extrait (pendant 3, 10 ou 20 min selon débit cellulaire) est très fréquemment un contrôle flux (sans irradiation). Pendant l'extraction, le programme LabVIEW (voir annexe E pour le suivi en temps réel) acquiert et enregistre les données brutes (post-traitement nécessaire) et les histogrammes établis en temps réel. En cas de perturbation du suivi (flux perturbé, tension biaisé par le laser de photoporation), des acquisitions en *High Speed Streaming* ou *Time Lapse* sur la caméra sont faites pour confirmer ou corriger le décompte final.

1. À la fin de l'extraction (objectif $\approx 10^4$ cellules), le tube de sortie est enveloppé dans de l'alumimium pendant 5-10 min pour permettre l'incorporation du FITC-Dextran et le maintenir dans l'obscurité.
2. 9-10 ml de DMEM(+ + +) préchauffé sont rajoutés et le tube est mis en incubateur avec le bouchon dévissé en attendant les extractions suivantes.
3. Une première centrifugation à 800 rpm pendant 8 min à température ambiante (≈22 °C) est faite à l'échantillon.
4. Le surnageant est évacué en laissant un culot de 100 µl et 2 ml de DPBS(- - -) sont rajoutés pour le rinçage.
5. Une deuxième centrifugation à 800 rpm pendant 8 min à température ambiante (≈22 °C) est effectuée.
6. Le surnageant est aspiré en laissant un culot de 100 µl qui est resuspendu.

Les traitement opto-fluidique nécessitent des échantillons contrôles notamment pour évaluer la contribution fluidique à la transfection ou son impact sur la viabilité. Deux échantillons supplémentaires sont à prévoir au minimum :

- L'échantillon *SM* qui consiste en un prélèvement de la solution mère mis en incubateur après la mise en flux (20 µl dans 10-13 ml de DMEM(+ + +) à 37 °C) qui n'aura été en contact ni avec le FITC-Dextran, ni agité, ni passé en écoulement. Il permet d'avoir un comparatif de croissance après la remise en suspension des cellules et le niveau basal de fluorescence.
- L'échantillon *SP* qui lui est prélevé en fin d'expérience du réservoir du flux porteur de cellule après trituration. Il consiste en 20 µl de la suspension, 1-2 ml de solution de FITC-Dextran à 2 mg/mlet un volume de DMEM(+ + +). Il s'agit d'un contrôle de croissance supplémentaire des effets de l'agitation et des durées d'expériences sur l'incorporation.

Ces deux échantillons subissent le même traitement que les échantillons d'intérêt à partir de l'étape de la mise en incubateur.

Avant de remettre les échantillons en culture (boîte fond de verre), une première prise d'images est faite sur 2.45 µl du culot dans des chambres de visualisation pour évaluer le nombre de cellules et potentiellement le taux de cellules transfectées (fig.C.1).

À l'issue de cette étape, les échantillons sont remis en suspension dans 1 ml de DMEM(+ + +) qui seront transférés sur le fond de verre des boîtes D35 dans un premier temps (ainsi toutes les cellules sont dans la zone d'imagerie). Après 2-3 h, 1 ml de DMEM(+ + +) sont rajoutés avant une deuxième prise d'images au 4x sur 9 positions.

À $J+1$, on débute par une prise d'images avec l'objectif 4x sur 9 positions. S'en suit un rinçage et changement de milieu avant une nouvelle prise d'images avec l'objectif 4x sur 9 positions. Pour quantifier proprement la fluorescence des cellules traitées (et vivantes), un marquage Hoechst est effectué pour des prises d'images avec l'objectif 20x successivement à 150 ms et 500 ms de tous les échantillons. Grâce au marquage des noyaux (segmentation simple), ces images sont prises en référence pour établir la croissance des cellules avec les sorties des segmentations des images avec l'objectif 4x. À $J+2$, on effectue une dernière série d'images avec l'objectif 20x pour pouvoir avoir une dynamique de croissance puisque le marquage Hoescht est encore détectable.

Les séquences d'imagerie ont été limitées pour éviter de trop solliciter par l'excitation le FITC-Dextran. Nous pourrions éventuellement effectuer un suivi long en araignée post traitement laser. Dans un premier temps, les D35 sont orientées de façons à pouvoir comparer spatialement un échantillon d'une séance d'imagerie à une autre. Par ailleurs, les données obtenues après la segmentation des images avec l'objectif 4x et l'objectif 20x sont uniformisées pour être analysées et transformées de manières identiques par des scripts de mise en forme de données.

2 Reconstruction des échantillons de photoporation pour les mesures locales

Afin d'avoir une image globale de l'échantillon, on crée une mosaïque d'images reconstruite à partir des images mises au point. Cela se fait selon une matrice en spirale (chaque élément correspondant à une position) pour correspondre au motif d'acquisition d'images établi automatiquement (fig.C.1). On peut ainsi visualiser certaines zones particulières (bords de l'échantillon, forte confluence, distance entre zone photoporées) et évaluer rapidement la fluorescence d'un échantillon ou sa population à l'aide d'ImageJ. Il est alors possible de repérer qualitativement l'évolution de certaines zones en fonction du temps. Par ailleurs, la représentation globale de toute la zone irradiée par le faisceau elliptique par exemple, permet la quantification local des canaux de fluorescence en corrélation avec le profil du laser.

Script MATLAB pour la reconstruction de l'échantillon suivant les motifs d'acquisition d'image

```
%%%%% Script to reorganize best foc output to map sample (P35)

clear all
%close all
clc

% Start with a folder and get a list of all subfolders.
% Finds and prints names of textfiles that folder and all of its subfolders.
% workspace;  % Make sure the workspace panel is showing.
format longg;
format compact;

% Locating folder of interest
% Define a starting folder and ending folder.
start_path_input = fullfile('~/Documents/ANALYSE_temp/');
start_path_output = fullfile('/media/mlayachi/DATA/DATA1/TLMic_Left/');
stpth_bckg = '~/Documents/ANALYSE_temp';


% Ask user to confirm or change.
topLevelFolder = uigetdir(start_path_input);
dwnLevelFolder = uigetdir(start_path_output);

if topLevelFolder == 0
```

```
    return;
end
% Get list of all subfolders.
allSubFolders = genpath(topLevelFolder);
% Parse into a cell array.
remain = allSubFolders;
listOfFolderNames = {};
while true
    [singleSubFolder, remain] = strtok(remain, ':');
    if isempty(singleSubFolder)
        break;
    end
    listOfFolderNames = [listOfFolderNames, singleSubFolder];
end
%
% bckgndFoldr = uigetdir(stpth_bckg,'Pick a BackGround offset directory');
% dir(bckgndFoldr);
% bckgndPtrn1 = input('Enter BackGround CAM file name \n','s')
% bckgndFile1 = strcat(bckgndFoldr,'/',bckgndPtrn1);
% bckgndPtrn2 = input('Enter BackGround InD file name \n','s')
% bckgndFile2 = strcat(bckgndFoldr,'/',bckgndPtrn2);
% fldmapPtrn2 = input('Enter field map file name \n','s')
% fieldCarto2 = strcat(bckgndFoldr,'/',fldmapPtrn2);
%
% bckGndImg1 = uint16(imread(bckgndFile1));
% bckGndImg2 = uint16(imread(bckgndFile2));
% fldmapImg2 = double(imread(fieldCarto2));
%
% bckGndMat = mean(bckGndImg1(:))*bckGndImg2./bckGndImg1 ;
% fldMapMat = fldmapImg2/mean(fldmapImg2(:));

% File discrim pattern based : get the focus location structure, extract
% list of folders (run folders) and prepare browsing and collecting

IvntryPatrn = sprintf('%s/FocusLocatioL20Xp.mat', topLevelFolder);
baseStrctNme = dir(IvntryPatrn);
StrcFoc = load(fullfile(topLevelFolder,baseStrctNme.name));
numberOfFiles = numel(StrcFoc.StrcFoc);
listOfChanFold = unique({StrcFoc.StrcFoc.MainDir},'stable');
numberOfFolders = numel(listOfChanFold);
%% Img-segm_channel0

for j=1:numberOfFolders
    thisFolder = listOfChanFold{j};
    fprintf('Processing folder %s\n', thisFolder);
    UndSC = regexp(thisFolder,'_');
    BckSL = regexp(thisFolder,'/');

    outpFolder = strcat(dwnLevelFolder,...
```

```
        thisFolder(BckSL(end-1):BckSL(end)),'Big_Pic_',...
        thisFolder(UndSC(end)+1:end));
    [outpStat,outpMesg] = mkdir(outpFolder);

    % By Folder isolation
    ismatchj = ~cellfun(@isempty, regexp({StrcFoc.StrcFoc.MainDir},...
        strcat(listOfChanFold{j},'$'),'matchcase'));
    StrFoldj = StrcFoc.StrcFoc(ismatchj);
    numberOfImStck = numel(StrFoldj);

    % Number of quadrants to recreate whole sample
    Nqad = ceil(sqrt(numberOfImStck));
    MapM = spiral(Nqad);
    CrdC = num2cell(MapM);
    MpC5 = cell(size(CrdC))
    MpC2 = cell(size(CrdC))
    MpC0 = cell(size(CrdC))
    VdfM = zeros(1024,1024);

    for k= 1:numberOfImStck
        % Bright field CH5
        imgNam5 = strcat(StrFoldj(k).MainDir,'/',StrFoldj(k).PosStck,...
            '/',StrFoldj(k).ChanNum5,'/',StrFoldj(k).FileNme5);
        fprintf('            Processing image file %s\n', imgNam5);
        imgStk5 = uint16(imread(imgNam5));
        imgFlt5 = imresize(imgStk5,0.5);%imflatfield(imgStk5,30);
```

3 Segmentation d'images issues de la microscopie avec l'objectif 20x

Un marquage Hoescht est effectué pour pouvoir détecter facilement les noyaux. La segmentation génère un masque de découpe qui sera appliqué à l'image en canal FITC après correction de champ. À chaque position et pour chaque noyau détecté, les métriques concernant la fluorescence sont enregistrées et renvoyées dans une structure pour chaque échantillon. En parallèle, les cellules fluorescentes sont détectées avec un seuil arbitraire. Ces données permettent de comparer la fluorescence de cette sous population et en extraire certains critères géométriques (circularité par exemple). Le script prend en argument d'entrée les fichiers de sorties des scripts détectant la mise au point. Il prend également les images de cartographie de champ (arrière plan et fluorescence) pour la correction de l'intensité de fluorescence.

Pour les images prises avec l'objectif 20x et un temps d'exposition plus long, il n'y a pas d'image en Hoechst pour éviter de saturer la caméra. Cette série d'images étant effectuée directement après celle avec un temps d'exposition plus court, l'analyse se base sur le canal Hoechst sur la première série puisque l'échantillon est toujours à la même position et la compatibilité entre les différents canaux est maintenue.

Script MATLAB pour la segmentation d'image avec l'objectif 20x avec $\tau_{exp} = 150$ ms

```
%%%% Script Segmentation 20X pour D35 J1p (sur Ph1)

clear all
close all
clc

% Start with a folder and get a list of all subfolders.
% Finds and prints names of txtfiles that folder and all of its subfolders.
% workspace;  % Make sure the workspace panel is showing.
format longg;
format compact;

% Locating
% Define a starting folder.
start_path = fullfile('~/Documents/ANALYSE_temp/');
stpth_bckg = '~/Documents/ANALYSE_temp';
% Ask user to confirm or change.
topLevelFolder = uigetdir(start_path,'Pick a 20X directory in  Par_dates');
if topLevelFolder == 0
    return;
end

bckgndFoldr = uigetdir(stpth_bckg,'Pick a BackGround offset directory');
dir(bckgndFoldr);
bckgndPtrn1 = input('Enter BackGround CAM file name \n','s')
bckgndFile1 = strcat(bckgndFoldr,'/',bckgndPtrn1);
bckgndPtrn2 = input('Enter BackGround InP/InM file name \n','s')
bckgndFile2 = strcat(bckgndFoldr,'/',bckgndPtrn2);
fldmapPtrn2 = input('Enter field map file name \n','s')
fieldCarto2 = strcat(bckgndFoldr,'/',fldmapPtrn2);
```

```
31
32  bckGndImg1 = uint16(imread(bckgndFile1));
33  bckGndImg2 = uint16(imread(bckgndFile2));
34  fldmapImg2 = double(imread(fieldCarto2));
35
36  bckGndMat = mean(bckGndImg1(:))*bckGndImg2./bckGndImg1 ;
37  fldMapMat = fldmapImg2/mean(fldmapImg2(:));
38
39  % Get list of all subfolders.
40  allSubFolders = genpath(topLevelFolder);
41  % Parse into a cell array.
42  remain = allSubFolders;
43  listOfFolderNames = {};
44  while true
45      [singleSubFolder, remain] = strtok(remain, ':');
46      if isempty(singleSubFolder)
47          break;
48      end
49      listOfFolderNames = [listOfFolderNames, singleSubFolder];
50  end
51
52  countrawch0 = 0;
53  countrawch2 = 0;
54  matratioraw = [];
55
56  IvntryPatrn = sprintf('%s/FocusLocaHSFL20Xp.mat', topLevelFolder);
57  baseStrctNme = dir(IvntryPatrn);
58  StrcFoc = load(fullfile(topLevelFolder,baseStrctNme.name));
59  numberOfFiles = numel(StrcFoc.StrcFoc);
60
61  %% Bck_up-retrial
62  % clearvars -except j numberOfFiles StrcFoc baseStrctNme IvntryPatrn ...
63  %         listPOfFolderNames singleSubFOlder remain topLevelFolder ...
64  %         startpath bckGndMat fldMapMat
65
66  %% Img-Segm_Corr
67  for j=1:numberOfFiles
68          %% Var-declare
69
70      clearvars -except j numberOfFiles StrcFoc baseStrctNme IvntryPatrn ...
71          listOfFolderNames singleSubFolder remain topLevelFolder ...
72          startpath bckGndMat fldMapMat matratioraw countrawch0 ...
73          countrawch2
74
75      % Main location
76      thisFolder = StrcFoc.StrcFoc(j).MainDir;
77      thisPos000 = StrcFoc.StrcFoc(j).PosStck;
78
79      % Check folder switch for printing summary
```

```
80
81      visfig = 'on';
82      if j<numberOfFiles
83          thisFldNxt = StrcFoc.StrcFoc(j+1).MainDir;
84          LastChk = ~strcmp(thisFldNxt(end-11:end),thisFolder(end-11:end));
85      else
86          LastChk = 1;
87      end
88
89      %Imported channels
90      thisChanl0 = StrcFoc.StrcFoc(j).ChanNum0;
91      thisFcImg0 = StrcFoc.StrcFoc(j).FileNme0;
92      thisChanl2 = StrcFoc.StrcFoc(j).ChanNum2;
93      thisFcImg2 = StrcFoc.StrcFoc(j).FileNme2;
94      thisChanl5 = StrcFoc.StrcFoc(j).ChanNum5;
95      thisFcImg5 = StrcFoc.StrcFoc(j).FileNme5;
96
97      fprintf('Processing folder %s\n', strcat(thisFolder,'/',thisPos000));
98
99      % Data storage for Hoescht channel (ch0)
100     StrFluo=struct([]);
101     ImgFil0 = sprintf('ImgFile_BF_%05d',1);
102     NumPst0 = sprintf('NumPost_BF_%05d',1);
103     CntFld0 = sprintf('Cntfld_BF_%05d',1);
104     % Data storage for FITC channel (ch2)
105     StrFitc=struct([]);
106     ImgFil2 = sprintf('ImgFile_FD_%05d',1);
107     NumPst2 = sprintf('NumPost_FD_%05d',1);
108     CntFld2 = sprintf('Cntfld_FD_%05d',1);
109     % Data Storage for Corresp hist (Ch0 Ch2)
110     StrCorr=struct([]);
111     ImgFlC0 = sprintf('ImgFile_HN_%05d',1);
112     ImgFlC2 = sprintf('ImgFile_FD_%05d',1);
113     CntThC0 = sprintf('Cntfld_HN_%05d',1);
114     CntThC2 = sprintf('Cntfld_FD_%05d',1);
115     SttC2C0 = sprintf('SttC2C_HN_%05d',1);
116     SttC2C2 = sprintf('SttC2C_FD_%05d',1);
117
118     % Segmentation mask and struct output
119     outpFoldr0 = strcat(StrcFoc.StrcFoc(j).FulfDes0(1:end-41),...
120         'MaskCorr_20X_',StrcFoc.StrcFoc(j).ChanNum0);
121     [outStat5,outpMsg5] = mkdir(outpFoldr0);
122     outpFoldr2 = strcat(StrcFoc.StrcFoc(j).FulfDes2(1:end-41),...
123         'MaskCorr_20X_',StrcFoc.StrcFoc(j).ChanNum2);
124     [outStat2,outpMsg2] = mkdir(outpFoldr2);
125     outpFoldrS = strcat(StrcFoc.StrcFoc(j).FulfDes2(1:end-41));
126
127     %% Img-file_import
128
```

```
    imgN0HN = strcat(thisFolder,'/',thisPos000,'/',thisChanl0,'/',...
        thisFcImg0);
    imgN2FD = strcat(thisFolder,'/',thisPos000,'/',thisChanl2,'/',...
        thisFcImg2);
    imgN5BF = strcat(thisFolder,'/',thisPos000,'/',thisChanl5,'/',...
        thisFcImg5);

    fprintf(...
        ' Processing HN imgfile %s\n Corresponding FD imgfile %s\n\n',...
        imgN0HN,imgN2FD);

    imgStk0 = imcomplement(uint16(imread(imgN0HN)));
    imgStk2 = imcomplement(uint16(imread(imgN2FD)));
    imgStk5 = uint16(imread(imgN5BF));
    %% Spot-detect_Ch0-2

    %Image Thresh and Prep
    Sens0 = 0.35; %0.35
    Sens2 = 0.55;
    % Chanel 0 Hoescht
    I00 = adapthisteq(imgStk0,'Nbins',65536);
    I01 = wiener2(I00, [10 10]);
%     bw0 = imbinarize(I01,'adaptive','ForegroundPolarity','dark',...
%         'Sensitivity',Sens0);
    % Chanel 2 (FITC)
    I20=adapthisteq(imgStk2,'Nbins',65536);
    I21 = medfilt2(I20);
    bw2 = imbinarize(I21,'adaptive','ForegroundPolarity','dark',...
        'Sensitivity',Sens2);
    %Chanel 5 BrightField
    I50 = adapthisteq(imgStk5,'Nbins',65536);
    %%
    %Spot detection Hoescht
    %I02 = imhmin(I01,15000);
    bw0 = imbinarize(I01,'adaptive','ForegroundPolarity','dark',...
        'Sensitivity',0.4);
    bw01 = imdilate(bw0,ones(10));%ones(3));
    bw02 = imopen(bw01, strel('diamond',15));%1));
    bw03 = bwareaopen(bw02,4);
    bw02_perim = bwperim(bw03);
    overlay01 = imoverlay(I00, bw02_perim, [1 .3 .3]);
    STATS0 = regionprops(bw02_perim,I00,'Perimeter','Area',...
        'Eccentricity','WeightedCentroid','Centroid');
    L04 = bwlabel(bw02_perim);
    bw05 = ismember(L04, find([STATS0.Perimeter]>=50 & ...
        [STATS0.Perimeter]<=1000 & [STATS0.Area]>=100 & ...
        [STATS0.Area]<=1000 ));
    [L05, num05] = bwlabel(bw05); %num5 after size criteria
    mask0 = im2bw(L05, 1);
```

```
178     overlay03 = imoverlay(I01, mask0, [1 .3 .3]);
179     figure; imshow(overlay03)
180
181     %bx01 = imtophat(I02,strel('diamond',10));
182     %bx02 = im2bw(bw01,graythresh(bw02));
183     Dx03 = -bwdist(bw03,'chessboard');
184     Dx03(bw03) = -Inf;
185
186     L06 = watershed_old(Dx03,8);
187     figure; imshow(label2rgb(L06,'jet','w'))
188     %%
189     %Spot detection FITC
190     bw22 = imopen(imcomplement(bw2), strel('diamond',3));
191     bw23 = bwareaopen(bw22,10);
192     bw22_perim = bwperim(bw23);%,18);
193     overlay21 = imoverlay(I20, bw22_perim, [1 .3 .3]);
194     STATS2 = regionprops(bw22_perim,I20,'Perimeter','Area',...
195         'Eccentricity','WeightedCentroid','Centroid');
196     L24 = bwlabel(bw22_perim);
197     bw25 = ismember(L24, find([STATS2.Perimeter]>=200 & ...
198         [STATS2.Perimeter]<=3000 & [STATS2.Area]>=300 & ...
199         [STATS2.Area]<=3000 ));
200     [L25, num25] = bwlabel(bw25); %num5 after size criteria
201     mask2 = im2bw(L25, 1);
202     overlay23 = imoverlay(I21, mask2, [1 .3 .3]);
203
204     %% CbC_analysis
205     % Comparing positions of ch 5 and ch 2
206     %
207     STATF0 = STATS0([STATS0.Perimeter]>=50 & ...
208         [STATS0.Perimeter]<=1000 & [STATS0.Area]>=100 & ...
209         [STATS0.Area]<=1000 );
210     STATF2 = STATS2([STATS2.Perimeter]>=200 & ...
211         [STATS2.Perimeter]<=3000 & [STATS2.Area]>=300 & ...
212         [STATS2.Area]<=3000);
213     % Preparing cell-by-cell quantification
214     bbHN = regionprops(L05,'BoundingBox','FilledImage');
215     im0 = I01;
216     bbFD = regionprops(L25,'BoundingBox','FilledImage');
217     Im2raw = imcomplement(imgStk2);
218     im2 = uint16(medfilt2(double(Im2raw - bckGndMat))./fldMapMat);
219     Sz = size(I00);
220     %%
221     % BBox from heoscht and monitoring corresponding fluo in FD
222     %
223     ObjClHNC=cellBX(bbHN,Sz,im0,im2,num05);
224     %Completing cell array with mean, sum , std computation
225     %%%% Amendement 04-10-2019 -> filled image of CH0cinstead of bounding
226     %%%% box
```

```
227     ObjClHNC(:,4)= cellfun(@(X,Y) uint16(X).*Y,...
228         ObjClHNC(:,2),ObjClHNC(:,3),...
229         'UniformOutput',false); % Cropped region in Ch0 BoundingBox
230     ObjClHNC(:,5)= cellfun(@(X) sum(X(:)),...
231         ObjClHNC(:,4),...
232         'UniformOutput',false); % CumIntens of Ch2 in cropped region
233     ObjClHNC(:,6)= cellfun(@(X,Y) X./numel(find(Y)),...
234         ObjClHNC(:,5),ObjClHNC(:,4),...
235         'UniformOutput',false); %Intensity per area of cropped region
236     ObjClHNC(:,7)= cellfun(@(X) std(double(X(:))),...
237         ObjClHNC(:,4),...
238         'UniformOutput',false); %Standar dev of intens. in ch2 Bndgbx2
239     ObjClHNC(:,8)= cellfun(@(X) max(double(X(:))),...
240         ObjClHNC(:,4),...
241         'UniformOutput',false); %Max of intens. in ch2 Bndgbx2
242     ObjClHNC(:,9)= cellfun(@(X) sum(X(:)),...
243         ObjClHNC(:,3),...
244         'UniformOutput',false); %CumIntens of Ch2 bndngbox0
245     %%%% Amendement 06-09-2019 -> add Area value (matlab)
246     ObjClHNC(:,10)={STATF0.Area}';
247
248     %BBox from FD and looking for histos to compare fluo cell to fluo cell
249     %
250     ObjClFDC=cellBX(bbFD,Sz,im2,im0,num25);
251     %Completing cell array with mean, sum , std computation
252     ObjClFDC(:,4)= cellfun(@(X,Y) uint16(X).*Y,...
253         ObjClFDC(:,2),ObjClFDC(:,1),...
254         'UniformOutput',false); % Cropped region in Ch2 BoundingBox
255     ObjClFDC(:,5)= cellfun(@(X) sum(X(:)),...
256         ObjClFDC(:,4),...
257         'UniformOutput',false); % CumIntens of Ch2 in cropped region
258     ObjClFDC(:,6)= cellfun(@(X,Y) X./numel(find(Y)),...
259         ObjClFDC(:,5),ObjClFDC(:,4),...
260         'UniformOutput',false); %Intensity per area of cropped region
261     ObjClFDC(:,7)= cellfun(@(X) std(double(X(:))),...
262         ObjClFDC(:,4),...
263         'UniformOutput',false); %Standar dev of intens. in ch2 Bndgbx2
264     ObjClFDC(:,8)= cellfun(@(X) max(double(X(:))),...
265         ObjClFDC(:,4),...
266         'UniformOutput',false); %Max of intens. in ch2 Bndgbx2
267     ObjClFDC(:,9)= cellfun(@(X) sum(double(imcomplement(X(:)))),...
268         ObjClFDC(:,3),...
269         'UniformOutput',false); %Sum of intensity in Ch0 Bndgbx2
270     %%%% Amendement 06-09-2019 -> add Area value (matlab)
271     ObjClFDC(:,10) = {STATF2.Area}';
272
273
274 %% Data_Output
275 %
```

```
276     % Struct_HN_Count.mat
277     StrFluo(1).(ImgFil0) = imgN0HN ;
278     StrFluo(1).(NumPst0) = Sens0 ;
279     StrFluo(1).(CntFld0) = num05 ;
280     str0=sprintf('Number of cells : %d',num05);
281     strsv0 = sprintf('CntCCMask_HN_%05d',j);
282     StrcFil0 = fullfile(outpFoldrS,'StrCor_HN_Count.mat');
283     countrawch0 = countrawch0 + num05;
284 %
285     if exist(StrcFil0, 'file')
286         StrApnd0 = matfile(StrcFil0,'Writable',true);
287         StrApnd0.StrFluo(1,end+1) = StrFluo;
288     else
289         save(StrcFil0,'StrFluo','-v7.3');
290     end
291
292     % Struct_FD_Count.mat
293     StrFitc(1).(ImgFil2) = imgN2FD ;
294     StrFitc(1).(NumPst2) = Sens2 ;
295     StrFitc(1).(CntFld2) = num25 ;
296     str2=sprintf('Number of fluo cells : %d',num25);
297     strsv2 = sprintf('CntCCMask_FD_%05d',j);
298     StrcFil2 = fullfile(outpFoldrS,'StrCor_FD_Count.mat');
299     countrawch2 = countrawch2 + num25;
300
301     if exist(StrcFil2, 'file')
302         StrApnd2 = matfile(StrcFil2,'Writable',true);
303         StrApnd2.StrFitc(1,end+1) = StrFitc;
304     else
305         save(StrcFil2,'StrFitc','-v7.3');
306     end
307
308     % Struct_C2C_Corr.mat
309     StrCorr(1).(ImgFlC0) = imgN0HN;
310     StrCorr(1).(ImgFlC2) = imgN2FD;
311     StrCorr(1).(CntThC0) = num05;
312     StrCorr(1).(CntThC2) = num25;
313     StrCorr(1).(SttC2C0) = ObjClHNC(:,4:10);
314     StrCorr(1).(SttC2C2) = ObjClFDC(:,4:10);
315     strsvS = sprintf('Summar8_C2C_%05d',j);
316     StrcFilC = fullfile(outpFoldrS,'StrCr8_C2C_Corr.mat');
317 %
318     if exist(StrcFilC, 'file')
319         StrApndC = matfile(StrcFilC,'Writable',true);
320         StrApndC.StrCorr(1,end+1) = StrCorr;
321     else
322         save(StrcFilC,'StrCorr','-v7.3');
323     end
324
```

```
325     f0=figure('visible','off','Name',str0,'Units','normalized',...
326         'Position',[0 0 1 1]);
327     subplot(2,3,1); imshow(imgStk0);
328     subplot(2,3,2); imshow(I01);
329     subplot(2,3,3); imshow(bw0);
330     subplot(2,3,4); imshow(overlay03);
331     subplot(2,3,5); imshow(I50); title(str0);
332     subplot(2,3,6); vislabels(L05);
333 %     pause(1)
334     f2=figure('visible','off','Name',str2,'Units','normalized',...
335         'Position',[0 0 1 1]);
336     subplot(2,3,1); imshow(imgStk2);
337     subplot(2,3,2); imshow(I21);
338     subplot(2,3,3); imshow(bw2);
339     subplot(2,3,4); imshow(overlay23);
340     subplot(2,3,5); imshow(I50); title(str2);
341     subplot(2,3,6); vislabels(L25);
342 %     pause(1)
343     if rem(j,289)-1==0 || LastChk ==1
344         saveas(f0,fullfile(outpFoldr0,strsv0), 'png');
345         saveas(f2,fullfile(outpFoldr2,strsv2), 'png');
346         fprintf('Saving masks.png in %s and %s\n',outpFoldr0,outpFoldr2);
347     else
348         fprintf('To see mask of %s, debug set f1 visible on\n',outpFoldrS);
349     end
350     f0.delete
351     f2.delete
352     %
353     if LastChk == 1
354         matratioraw  = [matratioraw;...
355             [countrawch0,countrawch2,countrawch2/countrawch0]];
356         %           visfig = 'off';
357         %           Debugg_CellSegmCorr20X;
358         countrawch0 = 0;
359         countrawch2 = 0;
360     end
361     %
362 %
363
364 end
```

4 Initialisation du nombre de cellules pour le suivi de croissance

Pour chaque série d'images, le nombre de cellules est ramené à une densité surfacique (selon le nombre d'images du motif d'imagerie). Il est ensuite normalisé par la densité de cellule mesuré à $J+1$ à l'objectif 20X. Des scripts intermédiaires de mise en forme de résultats sous forme de structures sont introduits pour uniformiser les sorties des scripts de segmentation avec les différents objectifs et séries d'images. En particulier pour la photoporation en flux, on compare le nombre de cellule obtenu *via* la barrière optique et l'acquisition des images en flux à celui donné par les images $J0$ sur les chambres de visualisation (fig. C.1).

Le script rassemble donc tous les fichiers obtenus après l'extraction des données de toutes les séries d'images. Il en extrait le nombre de cellules par position et prend en saisi des informations complémentaires (nombre de cellules capté en flux, nombre de cellules dans les chambre de visualisation et nombre de cellules rondes...).

Script MATLAB pour la compilation de l'évolution du nombre de cellules pendant le suivi par imagerie

```
for l = 1 : numbcurve
    uniqCORct{l}
    %%% Selecting samples
    sampleid20X=~cellfun(@isempty, regexp(runcatCOR, uniqCORct{l},...
        'match','once'));
    sampleid04X=~cellfun(@isempty, regexp(runcatcRs, uniqCORct{l},...
        'match', 'once'));
    %%% Locating time stamps 20X -04X
    undscrCOR = cellfun(@(X) regexp(X(1).ImgFile_HN_00001,'_'),...
        {strCOR(sampleid20X).StrCorr},...
        'UniformOutput',false);
    dotsepCOR = cellfun(@(X) regexp(X(1).ImgFile_HN_00001,'\.'),...
        {strCOR(sampleid20X).StrCorr},...
        'UniformOutput',false);
    undscrcRs = cellfun(@(X) X{1},cellfun(@(Y) regexp(Y,'_'),...
        {StrcRs(sampleid04X).ImgFile_BF},'UniformOutput',false),...
        'UniformOutput',false);
    dotsepcRs = cellfun(@(X) X{1},cellfun(@(Y) regexp(Y,'\.'),...
        {StrcRs(sampleid04X).ImgFile_BF},'UniformOutput',false),...
        'UniformOutput',false);
    %%% Computing surface coverage for cell density
    Srfcvg20X = num2cell(cellfun(@(X) numel(X)*scale20X,...
        {strCOR(sampleid20X).StrCorr}));
    Srfcvg04X = num2cell(cellfun(@(X) numel(X)*scale04X,...
        {StrcRs(sampleid04X).ImgFile_BF}));
    %%% Getting time stamps
    timestp20 = cellfun(@(X,Y,Z)...
        strcat(X(1).ImgFile_HN_00001(Y(end-2)+1:Y(end-1)-1),'_',...
        X(1).ImgFile_HN_00001(Z(end-1)-6:Z(end-1)-3)),...
        {strCOR(sampleid20X).StrCorr},undscrCOR,dotsepCOR,...
        'UniformOutput',false);
    timestp04 = cellfun(@(X,Y,Z)...
```

```
        strcat(X{1}(Y(end-2)+1:Y(end-1)-1),'_',...
        X{1}(Z(end-1)-6:Z(end-1)-3)),...
        {StrcRs(sampleid04X).ImgFile_BF},undscrcRs,dotsepcRs,...
        'UniformOutput',false);
    %%% Centring time on J1p (J+1 - 20X imaging)
    tpsrefJ1p = timestp20{1}
    %%% Converting time stamp to duration, find closer 04X to J1p
    DelTps20X = cellfun(@(X) (datenum(X,'dd_HHMM',2019)...
        - datenum(tpsrefJ1p,'dd_HHMM',2019))*24, timestp20,...
        'UniformOutput',false);
    DelTps04X = cellfun(@(X) (datenum(X,'dd_HHMM',2019)...
        - datenum(tpsrefJ1p,'dd_HHMM',2019))*24, timestp04,...
        'UniformOutput',false);
    [~,Nrstid04X] = min(cellfun(@(X) abs(X-DelTps20X{1}),DelTps04X));
    %%% Cell density with J1p as reference from J0 to J+2
    poprefJ1p = sum(...
        [strCOR(find(sampleid20X,1,'first')).StrCorr.Cntfld_HN_00001])...
        /Srfcvg20X{1}
    pop20Xraw = [num2cell(cellfun(@(X,Y) sum(X)/(Y*poprefJ1p),...
        cellfun(@(X) [X.Cntfld_HN_00001],{strCOR(sampleid20X).StrCorr},...
        'UniformOutput',false),Srfcvg20X));DelTps20X];
    pop04Xraw = [cellfun(@(X,Y) sum(X)/(Y*poprefJ1p),...
        {StrcRs(sampleid04X).CellBF_nb},Srfcvg04X,...
        'UniformOutput',false);DelTps04X];
    poprefJ1s = pop04Xraw{1,Nrstid04X}*poprefJ1p/Srfcvg04X{Nrstid04X};

    %%% Separating cell density between 4X and 20X (taking closer 4X to
    %%% J1p)
    pop20Xsep = pop20Xraw;
    pop04Xsep = [cellfun(@(X,Y) sum(X)/(Y*poprefJ1s),...
        {StrcRs(sampleid04X).CellBF_nb},Srfcvg04X,...
        'UniformOutput',false);DelTps04X];

    popmonitor = [pop04Xraw pop20Xraw];

    followuprefp.(uniqCORct{l}) = [poprefJ1p;datenum(tpsrefJ1p,...
        'dd_HHMM',2019);poprefJ1s];
    followupmatg.(uniqCORct{l}) = sortrows(cell2mat(popmonitor)',2);
    follupmatg04.(uniqCORct{l}) = sortrows(cell2mat(pop04Xsep)',2);
    follupmatg20.(uniqCORct{l}) = sortrows(cell2mat(pop20Xsep)',2);
end
```

ANNEXE D

PUCE MICROFLUIDIQUE ET MICROFABRICATION

1 Protocoles de microfabrication

La puce microfluidique est une géométrie implémentée dans un système verre-Si-verre. Cette fabrication nécessite plusieurs étapes consistant en l'assemblage des wafers de silicium et de verre. La lithographie optique est utilisée pour intégrer le motif de la géométrie sur le wafer en silicium qui est gravé suivant un procédé de gravure sèche profonde. La dernière étape vise à scellé le système en assemblant un deuxième wafer en verre et relier les canaux à l'extérieur.

Implantation de la géométrie

La géométrie microfluidique est dessinée avec le logiciel CleWin. Ce logiciel est un éditeur de plan conçu pour la lithographie (layout editor) permettant une résolution de l'ordre de nanomètre. Le dessin créé est rapporté ensuite sur un support pou créer le masque. Ce report peut se faire en déposant du chrome sur un substrat de quartz pour garantir une très grande résolution. Dans notre cas, les canaux sont de l'ordre de la centaine de micromètres et peuvent facilement être reproduits par impression à l'encre sur un support en plastique. Parallèlement, le substrat à graver est préparé en nettoyant les wafers de verre et de silicium avant leur collage. Les deux substrats de 3 puces de diamètres sont dépoussiérés avec un flux de N_2 avant d'être traités par plasma O_2 d'une puissance de 1000 W pendant 10 min. Les deux wafers sont mis en contact et ensuite coller à l'aide d'un colleur anodique (diagramme **(i)** fig.D.1).

Une résine photosensible (AZ15nXT) est ensuite déposée sur la face en silicium du substrat obtenu après collage. Le résinage se fait par *"spin coating"* : la résine est déposé sur une surface faisant 2 pouce de diamètre au centre du substrat qui est fixé sur un rotor. Ce dernier tourne avec une vitesse de 2500 tr/min pendant 30 s pour étaler la résine. Les conditions d'opération dépendent de la résine utilisée et sont calibrées pour obtenir une épaisseur de 8 µm. Le dépôt est ensuite réticuler à 110 °C, 3 min avant exposition à la lumière UV (365 nm, 45-55 s) avec un aligneur de masque. La résine étant négative, les liaisons dans les zones non irradiées (motifs du masques) sont fragilisées. Elles sont ensuite cassées par chauffage (120 °C, 1 min) avant le développement. Le substrat résiné et irradié est plongé pendant 2-3 min dans un récipient de développeur MIF326 jusqu'à révélation des motifs et enfin rincé à l'eau dé-ionisée.(diagramme **(ii)** fig.D.1).

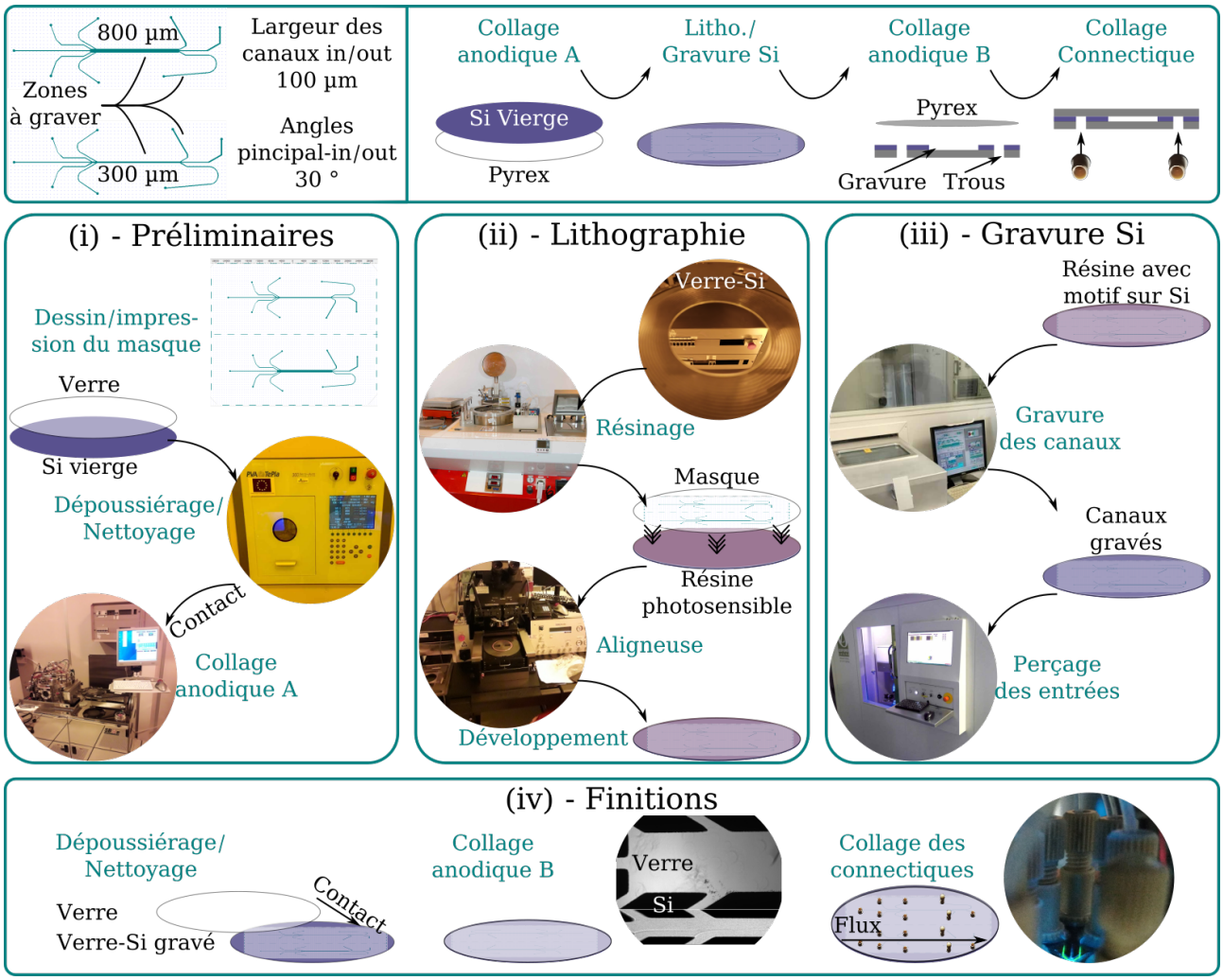


FIGURE D.1 – **Microfabrication d'une puce Verre-Si-Verre.**
Chaque assemblage Verre-Si-Verre contient deux puces microfluidiques avec respectivement des canaux principaux de 300 et 800 µm de large. Les entrées et sorties forment un angle de 30 °avec le canal principal et font 120 µm de large. Les étapes sont : un collage anodic verre-Si, la lithographie et la gravure du coté Si, un collage anodique pour refermer les canaux et enfin le collage des connectiques. **Diagramme** ***(i)*** Préparation pour l'étape de lithographie : fabrication du masque pour l'implantation des motifs géométriques et assemblage des wafers silicium et verre par collage anodique. **Diagramme** ***(ii)*** Lithographie optique sur résine négative des motifs des canaux microfluidique par irradiation UV. **Diagramme** ***(iii)*** Gravure des canaux microfluidique par gravure ionique réactive profonde (procédé Bosch) et perçage des accès au canaux par gravure optique (laser UV ns. **Diagramme** ***(iv)*** Finalisation de la puce microfluidique par deuxième collage anodique et installation des connectiques.

Création des canaux

Le procédé de gravure Bosch attaque les surfaces en Silicium non protégée par la résine réticulée. Un plasma haute densité à base de fluor (Hexafluorure de Soufre SF_6) génère des radicaux fluorés qui bombardent à la verticale la surface du substrat (Si). L'attaque chimique arrache des atomes de silicium en corrélation avec les motifs sur la résine. Se produit ensuite une phase de dépôt (ou passivation) à base de chimie flurocarbonée (C4F8, C2F6, CF4 ou CHF_3 – Ar). Cela permet de déposer une couche mince de polymère à base de fluorocarbone sur les surfaces du substrat et les flancs de gravures pour protéger le masque de résine et obtenir un rapport d'aspect (profondeur contre largeur des canaux) élevé. La gravure se poursuit en alternant les cycles de gravures (qui détruisent la couche de passivation partout sauf sur le flancs de gravure) et de passivation pour maintenir l'anisotropie. Le silicium (100 µm de profondeur) est ainsi gravé sélectivement. La dernière étape consiste à

percer les entrées (trous circulaires de diamètre ~ 200 µm) pour les arrivées des flux à l'aide d'un laser ns dans l'UV (diagramme **(iii)** fig.D.1).

Finalisation de la puce microfluidique

La finalisation de la puce reprend la première étape de collage pour sceller les canaux microfluidiques en ajoutant un wafer de verre au substrat gravé verre-Si. Le nettoyage au plasma O_2 permet l'élimination de la résine après gravure. Enfin, des connectiques en PTFE, pour relier les tubulures de flux aux entrées des canaux gravés, sont installés à l'aide d'une colle bi-composante. Tous les éléments constituant la puce microfluidique sont bio-compatibles (diagramme **(iv)** fig.D.1).

2 Le collage anodique

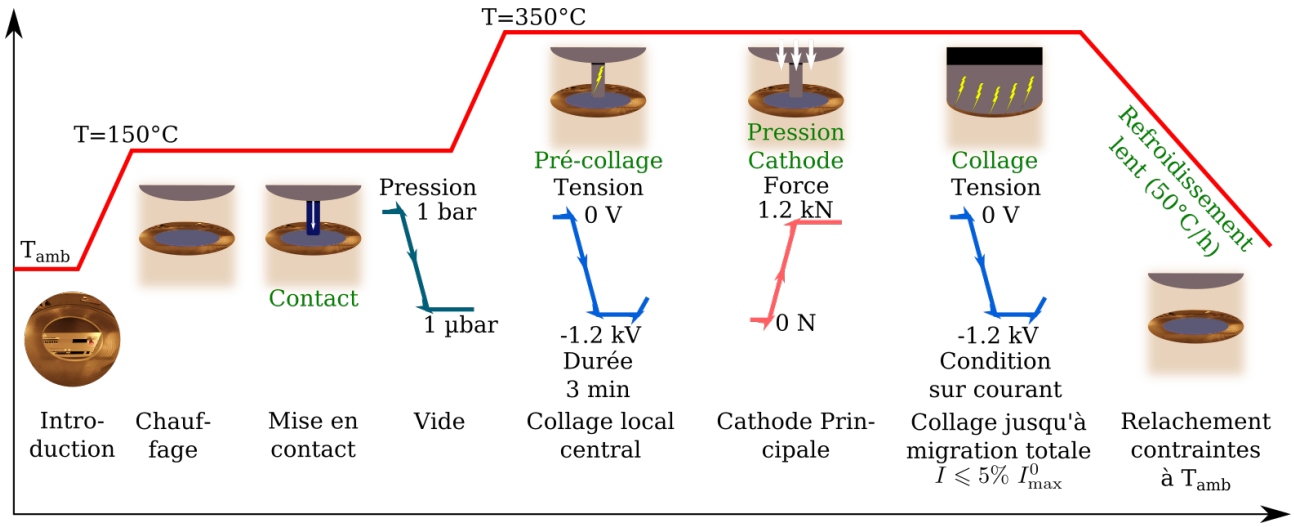


FIGURE D.2 – **Collage anodique verre silicium.**
Processus de collage anodique sur un système verre-silicium. La migration de charge se fait à haute température et en deux étapes. Un premier pré-collage se fait avec une petite électrode pour effectuer une migration au voisinage du centre des wafers. Ensuite, une électrode recouvrant toute la surface des wafers est mises en contact avec ces derniers et applique une pression mécanique pour favoriser les réactions chimiques à l'interface verre-silicium. Une différence de potentiel est appliquée tant que le courant mesuré entre anode et cathode est supérieur à $\sim 5\%$ de sa valeur initiale. Quand l'intensité descend en deçà de ce seuil, cela implique que les charges ont majoritairement migré vers la cathode. Le collage est alors achevé. La pression du deuxième outil est maintenue pendant le refroidissement lent pour réduire les effets de la dilatation thermique sur la planéité du substrat obtenu.

Le collage des substrats verre et silicium est réaliser par collage anodique (*"anodic bonding"*). Il s'agit d'un processus électrochimique basé sur la polarisation de verres contenant des ions alcalins (Na^+, K^+) en contact avec un substrat en silicium. Cette opération est réalisée en augmentant la température (300-450 °C) et en appliquant une différence de potentiel (400-1200 V) en reliant le verre à la cathode et le silicium à l'anode (fig.D.2).

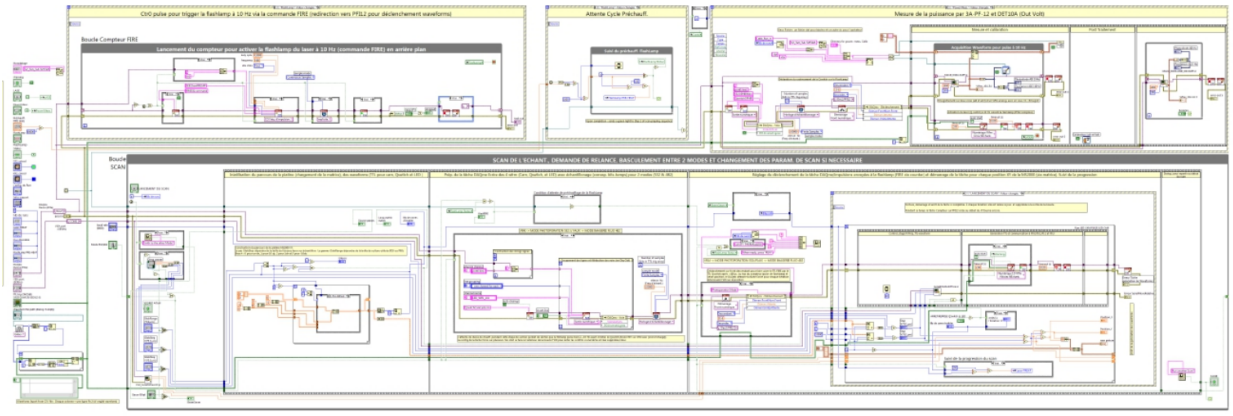
Quand une tension directe est appliquée à des verres riches en alcalins à haute température, les cations migrent de l'anode (au voisinage du Si) à la cathode. Dans le cas du pyrex, il s'agit essentiellement des ions Na^+. Quand la rugosité des deux substrat le permet, des réactions chimiques résultent de la déplétion en cation au voisinage de l'interface verre-Si. Elles impliquent l'oxydation du substrat en silicium. Une liaison est ainsi créée entre les deux substrat : le collage est réalisé [281].

Des contraintes s'appliquent donc aux propriétés chimiques (composition ionique) mais aussi aux propriétés physiques. En effet, l'augmentation de la température entraîne des phénomènes de dilatation thermiques qui peuvent causer des contraintes mécaniques pendant ou après le refroidissement. Ces contraintes résultent généralement en des défauts de planéité (flèche) du substrat collé qui compromettent les étapes suivantes de microfabrication. Les paramètres du collage anodique sont donc dépendantes du type de verre. Le changement du pyrex en du BK7 (seuil d'endommagement laser plus élevé, voir Chapitre 3) implique donc une étude pour optimiser le processus de collage (si l'on souhaite garder la couche de silicium).

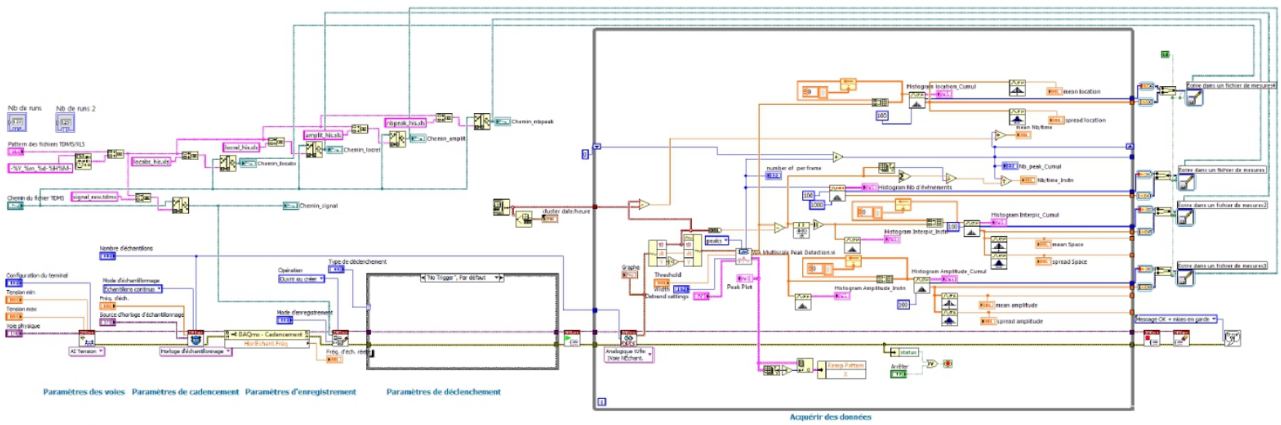
ANNEXE E

CONTRÔLE ET INTERFAÇAGE

1 Interfaçage pour la photoporation de cellules adhérentes



(a) **Instrument virtuel pour la photoporation de cellules adhérentes.**



(b) **Instrument virtuel pour la barrière optique.**

FIGURE E.1 – **Interfaçage du dispositif opto-fluidique à l'aide du logiciel LabVIEW.**

Nous souhaitons interfacer le protocole de photoporation de cellules adhérentes. Cela implique de mettre en place une séquence avec une prise d'image, un déclenchement du laser, une deuxième prise d'image et une translation de l'échantillon pour traiter une nouvelle zone.

Pour centraliser l'asservissement de tous les composants, nous avons opté pour le déclenchement par TLL 5 V, même si le laser par exemple, peut prendre des commandes ASCII en série permettant l'ouverture mécanique de la cavité ou le changement de la tension aux bornes de la Marx bank. Puisque les délais de déclenchement sont importants, la fréquence d'échantillonnage doit être élevée. En effet, le délai ($\sim$ 200 µs) entre impulsion de la flashlamp et le déchargement de la Pockels pour le laser va intervenir dans la puissance optique délivrée puisqu'il limite l'inversion de population (et donc le nombre de photon). Sur le plan de l'imagerie, le temps d'exposition de la caméra peut varier entre 20 µs et quelques centaines de ms. Avec des flux de données importants, il est nécessaire d'avoir une mémoire tampon conséquente. Tous ces éléments ont conduit à l'utilisation d'une carte PCIe 6323 Xseries avec un tampon digital. Cette même carte sera utilisée pour suivre les signaux de la barrière optique pendant les expériences en flux.

Objectif :
De façon interactive, le programme balaye une boîte de culture ou un échantillon quelconque soit pour effectuer un traitement de photoporation soit pour effectuer de l'imagerie en fluorescence (fig.E.1a).

Contraintes :

- Déclencher le laser en activant continuellement la flashlamp à 10 Hz et ensuite la cellule Pockels 180 µs après une impulsion de la flashlamp ;
- Activer la flashlamp à 10 Hz pour une durée de préchauffage et la maintenir pour une éventuelle utilisation ultérieure (en arrière plan) ;
- Pouvoir lancer l'imagerie sans pour autant solliciter le laser.

Structure :
Sur le panneau avant, choisir le mode (532 pour la photoporation ou 482 pour l'imagerie), activer selon le besoin le préchauffage de la flashlamp, définir le pas spatial de la translation de la platine et le domaine à balayer. Éventuellement, on peut changer les ports ou périphérique série (COM1 ou PCIe en Dev2) ou encore les formes des TTL à envoyer aux périphériques. Le diagramme est composé de :

- BOUCLE COMPTEUR FIRE (Intérêt WHILE : activable indépendamment de la boucle scan)
  Le VI commence par préchauffer la lamp flash en activant la Boucle Compteur FIRE émettant des signaux TTL de 10 µs en front descendant à $\sim$ 10 Hz (9,88 Hz) pour la durée précisée (2e étape de la séquence à l'intérieur de la Boucle Scan) ;
- BOUCLE MESURE Puissance
  Appel à sous-VI pour la mesure de puissance depuis la tête de puissance optique ;
- BOUCLE SCAN
  L'intérêt de la boucle WHILE est de ne déclencher l'itération suivante qu'avec un booléen vrai pour la boite de dialogue à la fin de la séquence de traitement ou de préchauffage ;

Au premier appel, il faut saisir le transfert du mode (photoporation ou imagerie), de la durée du préchauffage, des données spatiales (pas de translation, domaine et position) à la structure séquence. Sinon, la boite de dialogue pour la bascule de mode et le changement des paramètres spatiaux pour le traitement suivant s'affiche.

Chronologiquement, le VI procède comme suit :

1. Construction de la matrice pour le mouvement de la platine ;
2. Décompte pour le préchauffage (barre de progression sur panneau avant avec attente d'une occurrence selon le préchauffage) ;
3. Attribution des voies du port à activer pour le mode (photoporation ou imagerie) en voies numériques ;
4. Définition de l'échantillonnage pour interpréter les waveforms définis à l'extérieur (la création et les paramètres de la DAQmx sont à définir avant les itérations sur les positions pour la gestion des tâches ;
5. Fin de préchauffage le cas échéant, définition d'un déclenchement pour les autres waveforms suivant le compteur de la flashlamp : selon le mode (photoporation ou imagerie), le tableau de waveforms est adapté pour l'ouverture de la cavité laser (émission).
   Le balayage ne se lance qu'après confirmation de l'opérateur (bouton RUN sur panneau avant => boucle ÉVÈNEMENT) après la boîte de dialogue. La tâche DAQmx n'est supprimée qu'en sortie de boucle FOR :
   - Structure événement pour attendre que l'opérateur soit prêt ;
   - Boucle FOR pour l'interaction sur chaque élément de la matrice de position ;
   - Préparation de la Séquence 2 pour que l'étape suivante (écriture des waveformes) ne soit entamée qu'une fois la platine en position.
6. Demande à l'opérateur s'il prévoit un autre scan. Renvoi avant la séquence dans la boucle SCAN en nième appel. La flashlamp est toujours déclenchée à 10 Hz.

2 Suivi en temps réel de la dynamique cellulaire en flux

Ce VI permet l'acquisition du signal optique généré par le laser He-Ne (barrière optique) et converti en tension capté par la photodiode. Il a été construit autour d'un exemple permettant l'élimination de la composante tendancielle d'un signal type ECG. Ses réglages n'étant pas absolus, il permet, avec une vérification par vidéo, d'évaluer la dynamique cellulaire (fig.E.1b).

Il permet d'enregistrer les signaux brutes et les différents histogrammes construits en temps réel. Ces histogrammes sont indicatifs de la dynamique de l'écoulement et prennent en argument d'entrée certains seuils de détection comme la largeur ou l'amplitude minimale des pics. La quantification est faite *a posteriori* sur les signaux bruts.

Le laser $He - Ne$ continu est détecté sur la photodiode qui renvoie une tension non nulle (quasi constante). Au passage d'un objet, il y a extinction du signal. Le pic inversé détecté a une amplitude dépendant de la taille de l'objet et une large qui dépend de la vitesse. Les histogrammes sont ainsi construits pour suivre la fréquence des cellules dans le temps et leur taille.

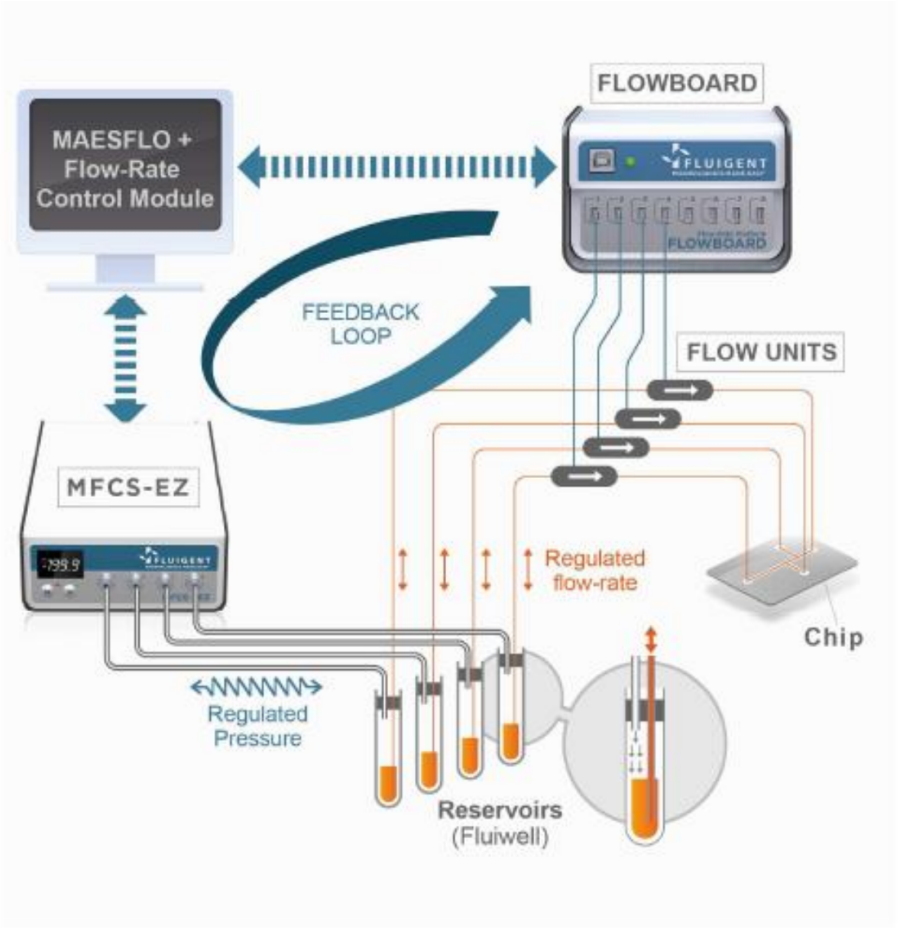


FIGURE E.2 – **Principe du contrôle en débit.**

3 Contrôle microfluidique

Le contrôle des flux a été réaliser par l'appareillage Fluigent. Les réservoirs sont alimentés en pression par une unité de pression (MFCS-EZ) reliée à un compresseur. Les débits sont mesurés par des débit-mètres. Ces F-Units sont reliés à une flowboard qui assure l'interfaçage avec le logiciel propriétaire. Pour pouvoir contrôler directement les débits, une identification doit être faite pour établir la relation entre la consigne de pression à chaque entrée et les débits mesurés. Cette calibration permet donc pour une consigne de débit, d'appliquer la pression adéquate pour faire correspondre les mesures de débits (fig.E.2).

L'identification consiste à faire varier les pressions de toutes les entrées de manière asynchrone et de mesurer les débits passant à travers les F-Units simultanément. L'opération, qui dure quelques minutes, établie une correspondance entre la valeur mesurée pour chaque débit-mètre et les valeurs de chaque sortie de pression. Des critères de rapidité de réponse et de priorité entre les débits sont intégrés comme degré de liberté de l'asservissement. Les pressions sont balayées dans une gamme définie par l'utilisateur (ici entre 50 et 300 mbar) pour établir les matrices de correspondances.

Après identification et pendant l'utilisation, le modèle est constamment suivi pour vérifier les variations par rapport aux consignes. Il s'adapte donc aux fluctuations de débits qui pourrait se produire selon les conditions aux limites du système fluidique (variation des volumes dans les réservoirs par exemple).

ANNEXE F

AGRÉGATS CELLULAIRES

1 Dissociation par cisaillement

Ce protocole a été affiné au fur et à mesure des essais. Les premières tentatives de photoporation en suspension ont été effectuées en optimisant le débit du porteur cellules. Avec l'approche de la photoporation à distance et particulièrement avec le séparateur (fig.5.2 du Chapitre 5) et les contraintes cadence de répétition du 532 nm, il a fallut réduire les débits. Sachant que pour un conduit de diamètre donné, la force de cisaillement sur l'écoulement varie avec la dérivée spatiale selon l'axe transverse du conduit.
La réduction du débit a mis en évidence un problème que l'on n'avait pas anticipé : mises en suspension, les cellules tendent à créer des agrégats ("*clumps*") qui peuvent obstruer le circuit microfluidique et détériorent l'arrangement des cellules dans la zone d'irradiation spatialement et temporellement (fréquence de passage des cellules non uniforme et présence de cellules non individualisées).

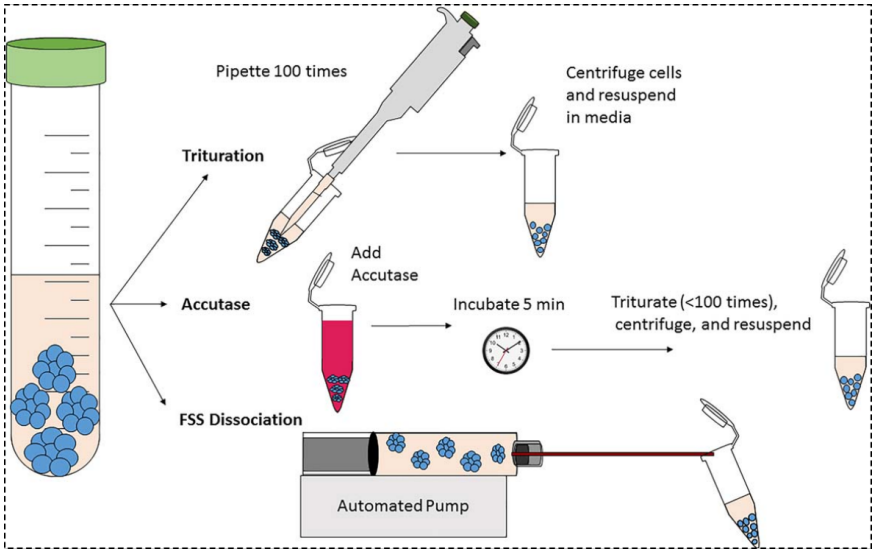
Pour palier à cela, nous avons revu l'étape de préparation de l'échantillon. En effet, des solutions commerciales existent et trouvent des applications en cytométrie en flux [282]. Cependant, l'utilisation de molécules pouvant altérer les propriétés membranaires peut introduire des biais dans la perméabilisation des cellules par génération de nano-bulles de vapeur. Nous savons que le traitement par Trypsine/EDTA permet la remise en suspension et la dissociation des cellules. En effet, la Trypsine vient cliver les acides aminés (lysine, arginine) responsables de l'adhésion à la surface de culture. L'EDTA est un chélateur des ions Ca^{2+} qui permet de briser les cadhérines responsables des interaction cellule à cellule. Il faut donc éliminer le FBS, les ions et les possibles débris d'ADN qui favorise l'interaction entre cellules [230, 283, 284].

Pour limiter la formation d'agrégats (*"clumps"*), nous avons remplacé le milieu complet du flux porteur de cellules par du tampon phosphate salin sans calcium ni magnésium (DPBS(- - -)). Sur les entrées des flux latéraux, séparateur ou porteur de nanoparticules, nous introduisons le DPBS sans calcium ni magnésium à 4.5 g/L de glucose (DPBS(- - +)). De cette manière, à la fin de l'écoulement dans le circuit microfluidique, les cellules se retrouvent en milieu minimal.

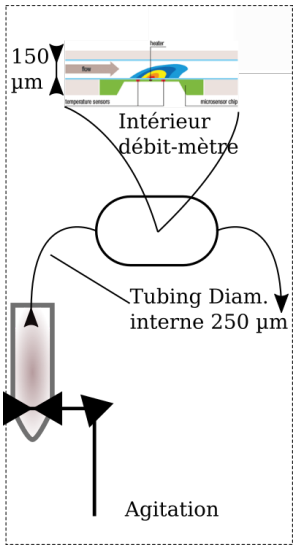
Par ailleurs, pour compenser la baisse des débits, nous avons remplacé les tubulures alimentant la puce microfluidique en suspension cellulaire et le débit-mètre correspondant pour augmenter le taux de cisaillement à débit fixé (5 µL/min) [232]. Les tubulures ont un diamètre intérieur de $\sim$ 125 µm pour une longueur de

$\sim$ 70 nm (fig.F.1a).

Enfin, pour éviter la déposition de cellules au fond du réservoir pendant l'extraction (et donc une dynamique dans le temps qui se dégrade), ce dernier est mis en agitation avec le moteur de rotation alimenté par un générateur de courant et une séquence de créneaux de pression sur le porteur cellule est appliquées après mise en flux (fig.F.1b).



(a) Techniques de dissociation [232]



(b) Cisaillement et agitation pendant l'injection en puce

FIGURE F.1 – Dissociation des agrégats cellulaires pendant le traitement opto-fludique

2 Préparatifs en amont : ensemencement

Typiquement, l'ensemencement se fait le Vendredi pour le Mardi ou le Lundi pour le Jeudi. Pour limiter le temps d'extraction des échantillons lors de la photoporation, il faut garantir une suspension finale de cellules à $1 - 2e6$ cell/mL dans un volume de 4 mL. Il faut prévoir généralement au minimum deux flasques T75 à la même dilution (1 :5) dans un milieu de culture classique complet (10% FBS, 1% L-glutamine et 0.4% Pénicilline-Streptomycine).

3 Préparatifs de l'échantillon

Les deux flasques ensemencées en amont sont traitées avec de la Trypsine/ETDA (1 mL, 5 min, 37 °C, 5%CO_2), remises en suspension dans 9 mL de milieu complet (DMEM(+ + +)), les suspensions centrifugées à 500 rpm pendant 3 min à température ambiante ($\approx$22 °C). Après aspiration du surnageant, les culots sont remis en suspension dans un volume finale de 4 mL de solution saline sans calcium ni magnésium (DPBS(- - -)) pour passage en puce.

Déroulé de la préparation à la mise en flux :

Le volume finale, le nombre d'aspiration/refoulement et les paramètres de centrifugation ont été fixés puisque

leurs variations ont coïncidé avec la présence d'agrégats lors de l'écoulement en puce microfluidique. L'étape de rajout du DMEM(+ + +) permet de neutraliser la Trypsine et favorise la formation d'un culot lors de la centrifugation

1. Aspirer le milieu initial des T75
2. Rincer les T75 au DPBS(- - -) (15 ml)
3. Rajouter de 1 ml de Trypsine/EDTA et incuber 5 min, 37 °C, 5% CO_2
4. Rajouter 9 ml de milieu DMEM(+ + +) dans chacune des flasques pour remettre les cellules en suspension
5. Effectuer une trituration ×10 (récolte et dissociation) avec une pipette 10 ml et vérifier les flasques sous microscopes.
6. SI nécessaire, trituration avec une pipette 5 ml et re-vérification.
7. Transférer les suspensions dans des tubes de 15 ml et centrifuger à 500 rpm pendant 3 min à température ambiante (≈22 °C)
8. Aspirer le surnageant et rajouter 1 ml DPBS(- - -) dans chaque tube.
9. Triturer avec une P1000 les culots remis en suspension (après vortex) et vérification du tube sous microscope.
10. Transférer les deux tubes dans le tube de solution mère pour un volume final de 4 ml avec trituration ×10.
11. Effectuer un comptage de la suspension finale. À titre indicatif, $0.7 - 0.8e6$ cell/ml permet d'avoir ≈ 10 cell/s et $1 - 2e6$ cell/ml ≈ $20 - 30$ cell/s.
12. Un dernier passage au vortex pendant 3 s.

En parallèle, la préparation FITC-Dextran et de l'intermédiaire de photoporation (AuNP) se fait par dissolution ou dilution dans du DPBS(- - +) aux concentration de 2 mg/mL et $8e7$ part./mL respectivement

4 Mise en flux et extraction (cas de la photoporation en flux)

Préalablement au passage puce de la solution mère préparée ci-dessus, le système microfluidique est purgé à l'aide de DPBS(- - -) pour s'assurer de l'élimination de débris d'échantillon, de javel résiduelle et de la stabilité des flux en asservissement débit avec l'identification usuelle. Dans le cas d'une photoporation par AuNP, le laser doit préférablement être stabilisé pendant deux à trois heures après optimisation des harmoniques. Pour rappel, le profil rhodamine B attendu est un FWHM transverse de $\approx 140 - 150$ µm. Avec ces dimensions, une puissance injectée de 500 mW équivaut à une fluence de 2.1 J/cm^2.

Déroulé de la mise en flux :

1. Transférer 3.5 mL du tube solution mère au réservoir opaque à relier à la tubulure avec débit-mètre adaptés au cisaillement.
2. Aspirer/refouler le réservoir et passer en contrôle pression pour mettre en flux (ne pas oublier de relier l'agitateur).

3. Repasser en contrôle débit et débuter le décompte temporel.
4. Effectuer la séquence $\{3 \text{ min} \Longrightarrow \Delta P + 100 \text{ mbar}(6 \text{ s})\} \times 3$ sur la pression du flux porteur de cellules en interrompant à chaque fois l'asservissement débit.
5. Effectuer un dernier créneaux de surpression $\{6 \text{ min} \Longrightarrow \Delta P + 100 \text{ mbar}(10 \text{ s})\}$

Pendant les séquences $\{\text{attente} - \text{surpression}\}$, remplacer les différents réservoirs restants par les porteurs FITC-Dextran ou AuNP. Initialement, le fluorophore est dilué dans toutes les entrées (y compris le porteur cellule). Pour éliminer le "bruit de fond" (incorporation passive dans le réservoir), le FITC-Dextran n'est apporté que par les autres entrées puisque l'essentiel de l'incorporation après perméabilisation des membranes se fait en sortie de puce.

Toujours dans le but de minimiser les contributions hors photoporation, un temps d'attente est nécessaire pour revenir au régime permanent fluidique après les perturbations en pression (augmentation du débit et donc du cisaillement $\Longrightarrow$ contraintes mécaniques sur la membrane).

Suivi temps réel :

Pour suivre la dynamique cellulaire en flux (nombre de cellules par unité de temps, agrégats, vitesse des cellules), un laser He-Ne a été installé en barrière optique détecté par une photodiode : chaque passage d'objet provoque une extinction. Une corrélation peut être faite entre amplitude et taille, largeur et vitesse. Les réglages ne sont malheureusement pas absolus. Pendant les 50 min d'attente après les consignes de surpression de la mise en flux, l'acquisition "*High Speed Streaming*" par caméra permet de vérifier que le décompte affiché par le VI (fig.E.1b en annexe E) est cohérent. La barrière optique est généralement positionnée au centre de la puce et le réglage des critères de seuil (largeur et amplitude minimum) sont établi avec la visualisation.

ANNEXE G

OUTILS DE SIMULATIONS

Dans cette annexe, des extraits des scripts établis pour le logiciel FreeFem++ sont présentés. Ils sont utilisés dans le cadre du chapitre 4. L'implémentation des schémas aux différences finies (Euler et Runge-Kutta) est également présentée.

1 Approche global du calcul pas à pas

Algorithme 1 Construction de l'histogramme de distribution de particule en 2D

Construction de la géométrie du domaine en 2D

Maillage initial en discrétisation chaque frontière

Définition du problème avec conditions aux limites

Résolution du problème sur le maillage initiale

Maillage adaptatif

Résolution du problème sur le maillage adapté

Organisation des particules avant lancement et définition du point de relevé de position finale

for $\forall$ particule au lancement **do**

  while $x \leq x_{\text{hist}}$ **do**
    Schéma d'Euler équation 8
    Renormalisation du pas de construction de trajectoire
  end while

end for

Histogramme à $x = x_{\text{hist}}$ pour $y \in [-w_s/2, w_s/2]$

1.1 Schéma d'Euler

```
func mesh3 PESu3D(mesh3 & Th, real & Theta, real & wR1, real & wR2, real & wE, real & Hc, real & lpm, real & lmax, real & kw, real & kn, int & Nit, real & xlim, string & Inst)
{
  cout <<"Particle Propagation : Initializing mesh..."<< endl;

  // Angle between upper inlet and central inlet

  real theta = pi*Theta/180;

  // Mesh & Geometry construction
  //Main coordinates
  real x1=wR2/wR1-1,x2=0;
  real y2=wR1/2,y1=wE/2,y3=0.15;
  real z1=-Hc,z2=Hc;

  // Building the Secondary Inlets
  real y4i = y3 + wR2/cos(theta);            // at x2, computation intermediairy
  real x5 = x2 - wR2*cos(theta);             // at y5, for the fictitious border
  real y5 = y4i + wR2*sin(theta);
  real x5i = x5 - wR2/sin(theta);            // at y5i, conputation intermediary for the fictitious border
  real x6 = x5 - 4*wR2*cos(theta) - cos(theta)*wR2/tan(theta) ;          // at y6, edge of the inlet channel
  real y6 = y5 + 4*wR2*sin(theta) + wR2*cos(theta);
  real x7 = x5i - 4*wR2*cos(theta);
  real y7 = y5 + 4*wR2*sin(theta);               // at y7, edge of the channel
  real x3 = x2 + (y4i - y1)/tan(theta);      // at y1, junction of focus zone and outlet
  real x4 = x3 + 1.5;               // at y1, edge of the outlet, initially 1.5

  // Fictitious border
  real xi = x6 ;//x6 inlet entrance + epsilon /x7 in-en/ x5i + cos(theta)*cos(theta)*(x5 - x5i) closer to the bifurcation (intermediary);
  real yi = y7- (x6-x7)*tan(theta);//y7- (x6-x7)*tan(theta) en-eps __/y7 in-en __/y5 - sin(theta)*cos(theta)*(x5 - x5i) bif;
  real yj = y6 -(x6-x7)*tan(theta); //y6 -(x6-x7)*tan(theta)en-eps __/y6 in-en/ y5 bif;

  // Finite element space

  fespace VVh(Th,P2); // Velocity fields
  VVh u,v,w;
  fespace Vh(Th,P0);  //Control function F=1 within domain, 0 else
  Vh F;
  F=1;
  //Loading the velocity field for the advection term from Stokes2Dvarf.edp

```

```
41  cout << "Extracting Data" << endl;
42  {
43    ifstream fu("champu3d"+Inst+".txt");
44    fu >> u[];
45  }
46  {
47    ifstream fv("champv3d"+Inst+".txt");
48    fv >> v[];
49  }
50  {
51    ifstream fw("champw3d"+Inst+".txt");
52    fw >> w[];
53  }
54  cout <<"Starting Main Task..."<< endl;
55
56  //MAIN
57  //Particle Propagation
58  //Iteration Parameters
59  int n=Nit;    // number of trials
60  int k=0;      // Particle counter
61
62  //Initializing histogram
63  real rnp=7e-5;    //radius of the AuNP
64  real epsilon=1e-4; //To keep away from borders
65  real xhist = x4 - xlim;
66  real countdbg = 0;
67  cout << "Processing ..."<< endl;
68
69  cout << "initial position ("<< xi <<","<< yi <<")" << endl;
70  cout << "Inside domain "<< F(xi,yi,0) << endl;
71  //Initial position
72  for (int j=0; j<2*n; j=j+1){
73    cout << j << " iteration. Bug Count  " << countdbg << endl;
74     for (int i=0; i<n; i=i+1){
75       real zk = z1 + 2*j*z2/(2*n+1) + 2/(j+1)*epsilon;
76       real yk = yi + epsilon + wR2*kw + i*(yj-yi)/(kn*n);
77       real xk = xi + (yk-yi)/tan(pi/2-theta);
78
79       //Space step and counter
80       k = k + 1 ;
81       real yp = yk + (y5-yi)/(kn*n);
82       real xp = xk + epsilon;
83       real zp = zk;
84       real tp = 0;
85       real vv,uu,ww;
86       real rnd, normv, norml, dtp;
87
88
89       { //file opening with appending (update after iteration)
```

```
90      ofstream fxp("propx"+Inst+".txt",append);
91      ofstream fyp("propy"+Inst+".txt",append);
92      ofstream fzp("propz"+Inst+".txt",append);
93      ofstream ftp("propt"+Inst+".txt",append);
94      ofstream hist("histogramtemp.dat",append);
95      //  ofstream histj("Histoj"+j+".dat",append);
96      ofstream check("Check.dat",append);
97      ofstream gnu("plot.dat",append);
98      ofstream trackY("trackingY.dat",append);
99      ofstream trackZ("trackingZ.dat",append);
100
101     gnu << xp <<" "<< yp << " " << zp << endl;
102
103     while (xp <= xhist){
104       ww=w(xp,yp,zp);
105       vv=v(xp,yp,zp);
106       uu=u(xp,yp,zp);
107       normv = sqrt(uu*uu + vv*vv + ww*ww); // norme de v
108       if (normv < 1e-10 /*&& F(xp,yp,zp)==0*/) { //initially 1e-10/1e-7
109         //yp=-10.;zp=-10.;
110         check << zp  << " " << xp << " " << yp << endl;
111         countdbg += 1;
112         break;
113       } //endof if break
114       norml = max(normv,1e-3);
115       //rnd = 2*pi*random()/(2^(31)-1);
116       dtp=lmax/norml;
117       tp = tp + dtp;
118       xp = xp + uu*dtp /*+ lpm*rnd/(2*pi)*/;
119       yp = yp + vv*dtp /*+ lpm*cos(rnd)*/;
120       zp = zp + ww*dtp /*+ lpm*sin(rnd)*/;
121
122       //Display (commented to spare process speed) and storage
123       //        cout << i << " " << countdbg  << " " << ww << "  " << uu << " " << zp
              << endl;
124       /*       ftp << tp << endl;
125           fxp << xp << endl;
126           fyp << yp << endl;
127           fzp << zp << endl;*/
128       // gnu << xp <<" "<< yp << " " << zp << endl;
129     }  // endof while
130     //      cout << i << " " << countdbg  << " " << ww << "  " << uu << " " << zp <<
          endl;
131     hist << xp <<" "<< yp << " "<< zp <<" " << tp << endl;
132     //  histj << i << " " << zk << " " << yp << " " << zk << " " << countdbg << endl;
133     trackY << k << " " << yp << endl;
134     trackZ << k << " " << zp << endl;
135       }; // closing files
136     } // endof for
```

```
137     } // endof for
138 
139     cout <<" Trajectory & Histogram root saved" << endl;
140     cout <<"Survey done!"<< endl;
141 
142 
143     return Th;
144 }
```

1.2 Schéma de Runge Kutta

```
//MAIN
//Particle Propagation
//Iteration Parameters
int n=Nit;    // number of trials
int k=0;      // Particle counter
real nok =0.;  // Particle achieved
//Initializing histogram
real rnp=7e-5;    //radius of the AuNP
real epsilon=1e-3; //To keep away from borders
real xhist = x4 - xlim;
real countdbg = 0;

func fRKx = u;
func fRKy = v;
func fRKz = w;

func V = F*sqrt(u*u + v*v +w*w); //Function producing velocity norme with condition inside mesh

macro k1x(fRKx,a,b,c) fRKx(a,b,c) //
macro k1y(fRKy,a,b,c) fRKy(a,b,c) //
macro k1z(fRKz,a,b,c) fRKz(a,b,c) //

macro k2x(fRKx,a,b,c,h) fRKx(a+h*k1x(fRKx,a,b,c)/4.0,b+h*k1y(fRKy,a,b,c)/4.0,c+h*k1z(fRKz,a,b,c)*0.25) //
macro k2y(fRKy,a,b,c,h) fRKy(a+h*k1x(fRKx,a,b,c)/4.0,b+h*k1y(fRKy,a,b,c)/4.0,c+h*k1z(fRKz,a,b,c)*0.25) //
macro k2z(fRKz,a,b,c,h) fRKz(a+h*k1x(fRKx,a,b,c)/4.0,b+h*k1y(fRKy,a,b,c)/4.0,c+h*k1z(fRKz,a,b,c)/4.0) //

macro k3x(fRKx,a,b,c,h) fRKx(a+3.0*h*k1x(fRKx,a,b,c)/32.0+9.0*h*k2x(fRKx,a,b,c,h)/32.0,b+3.0*h*k1y(fRKy,a,b,c)/32.0+9.0*h*k2y(fRKy,a,b,c,h)/32.0,c+3.0*h*k1z(fRKz,a,b,c)/32.0+9.0*h*k2z(fRKz,a,b,c,h)/32.0) //
macro k3y(fRKy,a,b,c,h) fRKy(a+3.0*h*k1x(fRKx,a,b,c)/32.0+9.0*h*k2x(fRKx,a,b,c,h)/32.0,b+3.0*h*k1y(fRKy,a,b,c)/32.0+9.0*h*k2y(fRKy,a,b,c,h)/32.0,c+3.0*h*k1z(fRKz,a,b,c)/32.0+9.0*h*k2z(fRKz,a,b,c,h)/32.0) //
macro k3z(fRKz,a,b,c,h) fRKz(a+3.0*h*k1x(fRKx,a,b,c)/32.0+9.0*h*k2x(fRKx,a,b,c,h)/32.0,b+3.0*h*k1y(fRKy,a,b,c)/32.0+9.0*h*k2y(fRKy,a,b,c,h)/32.0,c+3.0*h*k1z(fRKz,a,b,c)/32.0+9.0*h*k2z(fRKz,a,b,c,h)/32.0) //

macro k4x(fRKx,a,b,c,h) fRKx(a+1932.0*h*k1x(fRKx,a,b,c)/2197.0-7200.0*h*k2x(fRKx,a,b,c,h)/2197.0+7296.0*h*k3x(fRKx,a,b,c,h)/2197.0,b+1932.0*h*k1y(fRKy,a,b,c)/2197.0-7200.0*h*k2y(fRKy,a,b,c,h)/2197.0+7296.0*h*k3y(fRKy,a,b,c,h)/2197.0,c+1932.0*h*k1z(fRKz,a,b,c)/2197.0-7200.0*h*k2z(fRKz,a,b,c,h)/2197.0+7296.0*h*k3z(fRKz,a,b,c,h)/2197.0)//
```

```
32 macro k4y(fRKy,a,b,c,h) fRKy(a+1932.0*h*k1x(fRKx,a,b,c)/2197.0-7200.0*h*k2x(fRKx,a,b,
       c,h)/2197.0+7296.0*h*k3x(fRKx,a,b,c,h)/2197.0,b+1932.0*h*k1y(fRKy,a,b,c)
       /2197.0-7200.0*h*k2y(fRKy,a,b,c,h)/2197.0+7296.0*h*k3y(fRKy,a,b,c,h)/2197.0,c
       +1932.0*h*k1z(fRKz,a,b,c)/2197.0-7200.0*h*k2z(fRKz,a,b,c,h)/2197.0+7296.0*h*k3z(
       fRKz,a,b,c,h)/2197.0) //
33 macro k4z(fRKz,a,b,c,h) fRKz(a+1932.0*h*k1x(fRKx,a,b,c)/2197.0-7200.0*h*k2x(fRKx,a,b,
       c,h)/2197.0+7296.0*h*k3x(fRKx,a,b,c,h)/2197.0,b+1932.0*h*k1y(fRKy,a,b,c)
       /2197.0-7200.0*h*k2y(fRKy,a,b,c,h)/2197.0+7296.0*h*k3y(fRKy,a,b,c,h)/2197.0,c
       +1932.0*h*k1z(fRKz,a,b,c)/2197.0-7200.0*h*k2z(fRKz,a,b,c,h)/2197.0+7296.0*h*k3z(
       fRKz,a,b,c,h)/2197.0) //
34
35 macro k5x(fRKx,a,b,c,h) fRKx(a+439.0*h*k1x(fRKx,a,b,c)/216.0-8.0*h*k2x(fRKx,a,b,c,h)
       +3680.0*h*k3x(fRKx,a,b,c,h)/513.0-845.0*h*k4x(fRKx,a,b,c,h)/4104.0,b+439.0*h*k1y(
       fRKy,a,b,c)/216.0-8.0*h*k2y(fRKy,a,b,c,h)+3680.0*h*k3y(fRKy,a,b,c,h)/513.0-845.0*
       h*k4y(fRKy,a,b,c,h)/4104.0,c+439.0*h*k1z(fRKz,a,b,c)/216.0-8.0*h*k2z(fRKz,a,b,c,h
       )+3680.0*h*k3z(fRKz,a,b,c,h)/513.0-845.0*h*k4z(fRKz,a,b,c,h)/4104.0) //
36 macro k5y(fRKy,a,b,c,h) fRKy(a+439.0*h*k1x(fRKx,a,b,c)/216.0-8.0*h*k2x(fRKx,a,b,c,h)
       +3680.0*h*k3x(fRKx,a,b,c,h)/513.0-845.0*h*k4x(fRKx,a,b,c,h)/4104.0,b+439.0*h*k1y(
       fRKy,a,b,c)/216.0-8.0*h*k2y(fRKy,a,b,c,h)+3680.0*h*k3y(fRKy,a,b,c,h)/513.0-845.0*
       h*k4y(fRKy,a,b,c,h)/4104.0,c+439.0*h*k1z(fRKz,a,b,c)/216.0-8.0*h*k2z(fRKz,a,b,c,h
       )+3680.0*h*k3z(fRKz,a,b,c,h)/513.0-845.0*h*k4z(fRKz,a,b,c,h)/4104.0) //
37 macro k5z(fRKz,a,b,c,h) fRKz(a+439.0*h*k1x(fRKx,a,b,c)/216.0-8.0*h*k2x(fRKx,a,b,c,h)
       +3680.0*h*k3x(fRKx,a,b,c,h)/513.0-845.0*h*k4x(fRKx,a,b,c,h)/4104.0,b+439.0*h*k1y(
       fRKy,a,b,c)/216.0-8.0*h*k2y(fRKy,a,b,c,h)+3680.0*h*k3y(fRKy,a,b,c,h)/513.0-845.0*
       h*k4y(fRKy,a,b,c,h)/4104.0,c+439.0*h*k1z(fRKz,a,b,c)/216.0-8.0*h*k2z(fRKz,a,b,c,h
       )+3680.0*h*k3z(fRKz,a,b,c,h)/513.0-845.0*h*k4z(fRKz,a,b,c,h)/4104.0) //
38
39 macro k6x(fRKx,a,b,c,h) fRKx(a-8.0*h*k1x(fRKx,a,b,c)/27.0+2.0*h*k2x(fRKx,a,b,c,h)
       -3544.0*h*k3x(fRKx,a,b,c,h)/2565.0+1859.0*h*k4x(fRKx,a,b,c,h)/4104.0-11.0*h*k5x(
       fRKx,a,b,c,h)/40.0,b-8.0*h*k1y(fRKy,a,b,c)/27.0+2.0*h*k2y(fRKy,a,b,c,h)-3544.0*h*
       k3y(fRKy,a,b,c,h)/2565.0+1859.0*h*k4y(fRKy,a,b,c,h)/4104.0-11.0*h*k5y(fRKy,a,b,c,
       h)/40.0,c-8.0*h*k1z(fRKz,a,b,c)/27.0+2.0*h*k2z(fRKz,a,b,c,h)-3544.0*h*k3z(fRKz,a,
       b,c,h)/2565.0+1859.0*h*k4z(fRKz,a,b,c,h)/4104.0-11.0*h*k5z(fRKz,a,b,c,h)/40.0)//
40 macro k6y(fRKy,a,b,c,h) fRKy(a-8.0*h*k1x(fRKx,a,b,c)/27.0+2.0*h*k2x(fRKx,a,b,c,h)
       -3544.0*h*k3x(fRKx,a,b,c,h)/2565.0+1859.0*h*k4x(fRKx,a,b,c,h)/4104.0-11.0*h*k5x(
       fRKx,a,b,c,h)/40.0,b-8.0*h*k1y(fRKy,a,b,c)/27.0+2.0*h*k2y(fRKy,a,b,c,h)-3544.0*h*
       k3y(fRKy,a,b,c,h)/2565.0+1859.0*h*k4y(fRKy,a,b,c,h)/4104.0-11.0*h*k5y(fRKy,a,b,c,
       h)/40.0,c-8.0*h*k1z(fRKz,a,b,c)/27.0+2.0*h*k2z(fRKz,a,b,c,h)-3544.0*h*k3z(fRKz,a,
       b,c,h)/2565.0+1859.0*h*k4z(fRKz,a,b,c,h)/4104.0-11.0*h*k5z(fRKz,a,b,c,h)/40.0)//
41 macro k6z(fRKz,a,b,c,h) fRKz(a-8.0*h*k1x(fRKx,a,b,c)/27.0+2.0*h*k2x(fRKx,a,b,c,h)
       -3544.0*h*k3x(fRKx,a,b,c,h)/2565.0+1859.0*h*k4x(fRKx,a,b,c,h)/4104.0-11.0*h*k5x(
       fRKx,a,b,c,h)/40.0,b-8.0*h*k1y(fRKy,a,b,c)/27.0+2.0*h*k2y(fRKy,a,b,c,h)-3544.0*h*
       k3y(fRKy,a,b,c,h)/2565.0+1859.0*h*k4y(fRKy,a,b,c,h)/4104.0-11.0*h*k5y(fRKy,a,b,c,
       h)/40.0,c-8.0*h*k1z(fRKz,a,b,c)/27.0+2.0*h*k2z(fRKz,a,b,c,h)-3544.0*h*k3z(fRKz,a,
       b,c,h)/2565.0+1859.0*h*k4z(fRKz,a,b,c,h)/4104.0-11.0*h*k5z(fRKz,a,b,c,h)/40.0)//
42
43 real c1=25.0/216.0;
44 real c1s=16.0/135.0;
45 real c2=0.;
```

```
46  real c2s=0.;
47  real c3=1408.0/2565.0;
48  real c3s=6656.0/12825.0;
49  real c4=2197.0/4101.0;
50  real c4s=28561.0/56430.0;
51  real c5=-1.0/5.0;
52  real c5s=-9.0/50.0;
53  real c6=0.;
54  real c6s=2.0/55.0;
55  real k1xp,k2xp,k3xp,k4xp,k5xp,k6xp;
56  real k1yp,k2yp,k3yp,k4yp,k5yp,k6yp;
57  real k1zp,k2zp,k3zp,k4zp,k5zp,k6zp;
58  cout << "Processing ..."<< endl;
59
60  //Initial position
61  for (int j=0/*+mpirank*/; j<n; j+=1/*+mpisize*/){
62    for (int i=0; i<n-1; i+=1){
63      //       cout << "Iteration n("<< i << ","<< j <<") "<< endl;
64      real zk = z1 + 2*j*z2/(n+1) + 2/(j+1)*epsilon;
65      real yk = yi + epsilon + wR2*kw + i*(yj-yi)/(kn*n);
66      real xk = xi + (yk-yi)/tan(pi/2-theta);
67
68      //Space step and counter
69      k = k + 1 ; //counter
70      real yp = yk /*+ (y5-yi)/(kn*n)*/,ypi,yps; //initial values, yps 2nd evaluation,
            ypi intermediary
71      real xp = xk,xpi,xps; //Initial values
72      real zp = zk,zpi,zps,zp0; //initial values
73      real tp = 0; // Dah
74      real normv,normx,normy,normz;
75      real dgux=1e-6,dguy=1e-6,dguz=1e-6;
76      real Fx,Fy,Fz;
77      real dFx,dFy,dFz;
78      real dFx1,dFy1,dFz1;
79      real[int] dFj(3);
80      real deltax,errx,deltay,erry,deltaz,errz,errp=1e-6;
81      real normr=1e-6;
82      real hold,h,d=lmax; // normv velocity, norm(y-z) error between p and ps based,
            normr required error, h step
83
84      normv = V(xp,yp,zp);
85
86      { //file opening with appending (update after iteration)
87    ofstream fxp("propx"+Inst+".txt",append);
88    ofstream fyp("propy"+Inst+".txt",append);
89    ofstream fzp("propz"+Inst+".txt",append);
90    ofstream ftp("propt"+Inst+".txt",append);
91    ofstream histY("histogramY.dat",append);
92    ofstream histZ("histogramZ.dat",append);
```

```
93      //      ofstream histj("Histoj"+j+".dat",append);
94      ofstream check("Check.dat",append);
95      ofstream gnu("plot.dat",append);
96      ofstream trackY("trackingY.dat",append);
97      ofstream trackZ("trackingZ.dat",append);
98
99      gnu << xp <<" "<< yp << " " << zp << endl;
100
101     while (xp <= xhist){
102       if (normv < 1e-7){
103         xp = xpi + errx*dFx1*(d^2/h^2)/dgux;// errp := normr
104         yp = ypi + erry*dFy1*(d^2/h^2)/dguy;// errp := normr
105         zp = zpi + errz*dFz1*(d^2/h^2)/dguz;// errp := normr
106         //       cout << " 1e correct x y z "<<xp<< " " << yp << " " << zp << " "  <<V(
              xp,yp,zp)<<" %%%%%%%%%"<< endl;
107         normv = V(xp,yp,zp);
108         if (normv < 1e-7){
109           xp = xp + dFx1*errx*(d^2/h^2)/dgux;// *dFx
110           yp = yp + dFy1*erry*(d^2/h^2)/dguy;// *dFy
111           zp = zp + dFz1*errz*(d^2/h^2)/dguz;// *dFz
112           normv = V(xp,yp,zp);
113           //            cout << "%%%%%%%%%%%%%%%%2e correct "<< xp<< " " << yp << " " <<
                zp << " "<< normv <<endl;
114           if (normv < 1e-7){
115         xp = xp + dFx1*dFx*errx*((d/h^2)/dgux)^2;// := normr
116         yp = yp + dFy1*dFy*erry*((d/h^2)/dguy)^2;// := normr
117         zp = zp + dFz1*dFz*errz*((d/h^2)/dguz)^2;// := normr
118         normv = V(xp,yp,zp);
119         cout << "%%%%%%%%%%%%%%%%3e correct "<< xp<< " " << yp << " " << zp << " "<<
              normv <<endl;
120         }
121         }
122       }
123       if (normv<1e-7){
124         //h=d/1e-7;
125         check << zp  << " " << xp << " " << yp << endl;
126         countdbg+=1;
127         break;
128       }
129       else{
130       h=d/normv;
131       }
132
133       dgux = 2*(u(xp,yp,zp)*dx(u)(xp,yp,zp)+v(xp,yp,zp)*dx(v)(xp,yp,zp)+w(xp,yp,zp)*dx(
            w)(xp,yp,zp));
134       dguy = 2*(u(xp,yp,zp)*dy(u)(xp,yp,zp)+v(xp,yp,zp)*dy(v)(xp,yp,zp)+w(xp,yp,zp)*dy(
            w)(xp,yp,zp));
135       dguz = 2*(u(xp,yp,zp)*dz(u)(xp,yp,zp)+v(xp,yp,zp)*dz(v)(xp,yp,zp)+w(xp,yp,zp)*dz(
            w)(xp,yp,zp));
```

```
136
137     k1xp=k1x(fRKx,xp,yp,zp);
138     k2xp=k2x(fRKx,xp,yp,zp,h);
139     k3xp=k3x(fRKx,xp,yp,zp,h);
140     k4xp=k4x(fRKx,xp,yp,zp,h);
141     k5xp=k5x(fRKx,xp,yp,zp,h);
142     k6xp=k6x(fRKx,xp,yp,zp,h);
143     k1yp=k1y(fRKy,xp,yp,zp);
144     k2yp=k2y(fRKy,xp,yp,zp,h);
145     k3yp=k3y(fRKy,xp,yp,zp,h);
146     k4yp=k4y(fRKy,xp,yp,zp,h);
147     k5yp=k5y(fRKy,xp,yp,zp,h);
148     k6yp=k6y(fRKy,xp,yp,zp,h);
149     k1zp=k1z(fRKz,xp,yp,zp);
150     k2zp=k2z(fRKz,xp,yp,zp,h);
151     k3zp=k3z(fRKz,xp,yp,zp,h);
152     k4zp=k4z(fRKz,xp,yp,zp,h);
153     k5zp=k5z(fRKz,xp,yp,zp,h);
154     k6zp=k6z(fRKz,xp,yp,zp,h);
155
156     //X Position evaluation with RK4(5)
157     xpi = xp + h*(c1*k1xp + c2*k2xp + c3*k3xp + c4*k4xp + c5*k5xp + c6*k6xp);
158     xps = xp + h*(c1s*k1xp + c2s*k2xp + c3s*k3xp + c4s*k4xp + c5s*k5xp + c6s*k6xp);
159     //cout << xp  << "%%%%%%%%%% "<< xpi <<" %%%%%%%%% " << xps << endl;
160     deltax = xps-xpi;
161     errx = abs(deltax);
162
163     //Y Position evaluation with RK4(5)
164     ypi = yp + h*(c1*k1yp + c2*k2yp + c3*k3yp + c4*k4yp + c5*k5yp + c6*k6yp);
165     yps = yp + h*(c1s*k1yp + c2s*k2yp + c3s*k3yp + c4s*k4yp + c5s*k5yp + c6s*k6yp);
166     //cout << yp  << "%%%%%%%%%%%%%% "<< ypi <<" %%%%%%%%%%%%%% " << yps << endl;
167     deltay = yps-ypi;
168     erry = abs(deltay);
169
170     //Z Position evaluation with RK4(5)
171     zpi = zp + h*(c1*k1zp + c2*k2zp + c3*k3zp + c4*k4zp + c5*k5zp + c6*k6zp);
172     zps = zp + h*(c1s*k1zp + c2s*k2zp + c3s*k3zp + c4s*k4zp + c5s*k5zp + c6s*k6zp);
173     //cout << zp  << "%%%%% "<< zpi <<" %%%%% " << zps << endl;
174     deltaz = zps - zpi;
175     errz = abs(deltaz);
176     errp = sqrt(errx^2+erry^2+errz^2);
177
178     Fx=F(xpi,yp,zp);
179     Fy=F(xp,ypi,zp);
180     Fz=F(xp,yp,zpi);
181
182     dFx = xp - xpi;
183     dFy = yp - ypi;
184     dFz = zp - zpi;
```

```
185
186       dFj[0] = abs(F(xp,yp,zp) - Fx)/abs(dFx);
187       dFj[1] = abs(F(xp,yp,zp) - Fy)/abs(dFy);
188       dFj[2] = abs(F(xp,yp,zp) - Fz)/abs(dFz);
189
190       /*      for (int ip=0;ip<3;ip++){
191         if (dFj[ip]!=0){
192           dFj[ip]=1;
193         }
194         else{
195           dFj[ip]=0;
196         }
197         }*/
198       dFx1=dFj[0];dFy1=dFj[1];dFz1=dFj[2];
199
200       //Assigning values
201
202       tp = tp + h;
203       xp = xps;
204       yp = yps;
205       //zp = zps;
206       zp = min(zps,0.179);
207       zp = max(zps,-0.179);
208       normv = V(xp,yp,zp);
209
210       //      cout << "Param x"<< errx << " y "<< erry << " z " << errz << " pas d "<<
              d << endl;
211       //      cout << " errp "<< errp <<" position x "<< xp << " y "<< yp << " z " <<
              zpi << " NormV " << normv <<endl;
212       if (normv < 1e-7){
213         xp = xp + dFx1*dFx*(d^2/h^2)/dgux;
214         yp = yp + dFy1*dFy*(d^2/h^2)/dguy;
215         zp = zp + dFz1*dFz*(d^2/h^2)/dguz;
216         //      cout << "%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%" << Fx  << "%%%%% "<< Fy <<" %%%%% " << Fz
                << endl;
217         //      cout << "%%%%%%%%" << dFx  << "%%%%% "<< dFy <<" %%%%% " << dFz << endl
                ;
218         cout << dFx1  << "%%%%% "<< dFy1 <<" %%%%% " << dFz1 << endl;
219         //      cout << "Correc0 "<<d<< " --position x "<< xp << " y "<< yp << " z " <<
              zp <<" Nv "<< normv << " " << V(xp,yp,zp) << endl;
220         normv = V(xp,yp,zp);
221       }
222       //Adapting space step
223       d = 0.84*d*(normr/errp)^(0.25);
224       //      cout << "%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%% grad x y z "<<dgux<< " " <<
              dguy << " " << dguz << endl;
225       //      cin >> mark ;
226       //      if (mark == 1) continue;
227     }  // endof while <=xhist
```

```
228
229     nok += 1;
230     histY << yp << endl;
231     histZ << zp << endl;
232     //   histj << j << " " << zk << " " << yp << " " << zp <<" "<< countdbg << " " <<
            nok << endl;
233     trackY << k << " " << yp << endl;
234     trackZ << k << " " << zp << endl;
235     //} // endof if
236     cout <<  i << "," <<j<< ") x  " << xp << " y " << yp << " z " << zp  <<" "<<
            countdbg << endl;
237       }; // closing files
238     } // endof for i loop
239   } // endof for j loop
240
241 cout <<" Trajectory & Histogram root saved" << endl;
242 cout <<"Survey done!"<< endl;
```

2 Etablissement du maillage et résoltution des problèmes 3D

```
plot(Thi, wait=1);
cout << "%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%% Extrusion of the 2D mesh for 3D building " << endl;

// Building 3D (Finally...)

//   int[int] r2=[10,1,15,4,16,5,18,6], r1=[0,7], r3=[0,8];  //replaced 7 & 8 by 5 in r1, r3
//   func zmin=-z2;
//   func zmax=z2;
real zdelta=0.1;

int[int] r2=[10,1,11,2,12,3,13,31,14,32,15,4,16,5], r1=[0,7], r3=[0,8];  //replaced 7 & 8 by 5 in r1, r3
func zmin=-z2;//*(x>=x2b)-z2*(x<x2b)*(abs(y)>y2+0.001)-sqrt(abs(y2^2-(y*0.99)^2))*(x<x2b)*(abs(y)<=y2+0.001);
func zmax=z2;//*(x>=x2b)+z2*(x<x2b)*(abs(y)>y2+0.001)+sqrt(abs(y2^2-(y*0.99)^2))*(x<x2b)*(abs(y)<=y2+0.001);
int  Ndis3 =4; //15,10
mesh3 Th3i=buildlayers(Thi,Ndis3, coef=max((zmax-zmin)/zmax,1./Ndis3), zbound=[zmin, zmax], labelmid=r2, labelup = r1, labeldown = r3 );

cout << "%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%% Adding inlets for the Z-focus " << endl;

mesh3 Th3= Th3i;

medit("Th_3D",Th3);

//savemesh(Th3,"Th3D_"+Inst+".meshb");

//Velocity field, streamlines and adaptmeshing with Stokes2Drf.idp
Th3=NStokes3D(Th3,Inst,Theta,mrkNS,q1,q2,q3,q4,wR1,wR2,Hc,Posz,Rin);

//Velocity field, streamlines and adaptmeshing with NS3D_debugg.idp
//  Th3=NS3D(Th3,Inst,Theta,mrkNS,q1,q2,q3,q4,wR1,wR2);

//Velocity field, streamlines and adaptmeshing with NS3D_debugg.idp
//  Th3=NS3Debugg(Th3,Inst,Theta,mrkNS,q1,q2,q3,q4,wR1,wR2);

//Particle distribution, adaptmeshing with Ditrib2D.idp (the mesh is only the mule for now)
// mesh3 ThAD=advecdif3D(Th3,mark,nu,Inst);

//Particle propagation, adaptmeshing with Porpag2D.idp
if (mrkPP == 1){
  mesh3 ThAP=PESu3D(Th3,Theta,wR1,wR2,wE,Hc,lpm,St,kw,kn,Nitp,xR,Inst);
```

```
40      }
41      else if(mrkPP==2){
42        mesh3 ThAP=propRuKu3DG(Th3,Theta,wR1,wR2,wE,Hc,lpm,St,kw,kn,Nitp,xR,Inst);
43      }
44      else if(mrkPP==3){
45        mesh3 ThAP=propRuKu3DGB(Th3,Theta,wR1,wR2,wE,Hc,lpm,St,kw,kn,Nitp,xR,Inst);
46      }
47      else if(mrkPP==4){
48        mesh3 ThAP=propRuKu3DGT(Th3,Theta,wR1,wR2,wE,Hc,lpm,St,kw,kn,Nitp,xR,Inst);
49      }
50      else if(mrkPP==0){
51        cout <<" Running file dispatch " << endl;
52      }
53      //Particle trajectory construction with Prop_RK.idp
54      //mesh3 ThRK=propRuKu3D(Th3,Theta,wR1,wR2,wE,lpm,St,kw,kn,Nitp,xR,Inst);
```

3 Approche pour la rhéologie en environnement microfluidique

```
func mesh NSmovec3D(mesh & Thchip, real & Rc,string & Inst,real & Theta, int & mrkNS,
    real & q1, real & q2, real & q3, real & wR1, real & wR2, real & Hc, real & xca,
    real & xcl, real & ycl, real & xcr, real & ycr, real & xcb, real & ycb)
{
  cout <<"Velocity field with Stokes : Initializing mesh..."<< endl;

  real theta = pi*Theta/180;
  real time, dt,Nitconv;
  // Channel cross section area
  real ch1 = 2*Hc*wR1;
  real ch2 = 2*Hc*wR2;

  //biocell position
  real xcref = xcb-abs(abs(xca-xcl)-abs(xcb-xcr))/2-0.05,ycref=ycb-abs(abs(ycb-ycl)+abs
      (ycb-ycr))/2+0.8*wR2/cos(theta);
  real xc = xcref/*-0.3*/+0.05,yc =ycref/*-0.2*/;
  real xnp= xcref/*-0.05*/+0.05,ynp=-ycref ;
  real probx,proby,probxold=xcref-0.3,probyold=ycref-0.2;

  // Mesh import and creation
  mesh Th = Thchip; // microfluidic chip
  plot(Th,wait=false);

  border HFc(t=0,2*pi){x=xc + Rc*cos(t) ; y = yc + Rc*sin(t); label = 181;}
  mesh Thcell = buildmesh(HFc(60));
  mesh Ch = Thcell; // biocell in plane Oxy
  plot(Thcell,wait=false);

  border Binl(t=0,1){x=-5*Rc ; y = Hc*(1-2*t); label = 1;}
  border Bout(t=0,1){x=5*Rc ; y = -Hc*(1-2*t); label = 5;}
  border Btop(t=0,1){x=5*Rc*(1-2*t) ; y = Hc; label = 6;}
  border Bdwn(t=0,1){x=-5*Rc*(1-2*t) ; y = -Hc; label = 6;}
  border VFc(t=0,2*pi){x= Rc*cos(t) ; y = Rc*sin(t); label = 182;}
  mesh Tvcell = buildmesh(Binl(40)+Bout(40)+Btop(40)+Bdwn(40)+VFc(-60));
  mesh Tv = Tvcell;
  plot(Tv,wait=false);

  // Weak formulation and finite elements for 2D
  // Finite element space

  fespace Vh(Th,P2); // for whole chip
  Vh u,v,uold,vold,ut,vt; //speedx, speedy, speedx_last-iter,speedy_last-iter,
      speedx_test-func, speedy_test-func %%%%%%%%%% unit mm/ms
  Vh shearx,sheary; //shear-stress_alongx, shear-stress_alongx
  Vh posx,posy;  //xcoord_map, ycoord_map %%%%%%%%%% unit mm
```

```
42  Vh c,cold,cp,cpold,np,npold; //cell_repres-convect, cell_repres-lstiter, aunp_repres-
        convect, aunp_repres-lstiter %%%%%%%%%% unit a.u
43  Vh clust,probe; //multi_cell-flow, cellpos_track %%%%%%%%%% unit a.u
44
45  fespace VVh(Th,P1); // for whole chip
46  VVh p,pt; // pressure, pressure_test-func %%%%%%%%%% unit kPa
47
48  fespace Xh(Ch,P2); // for cell in the Oxy plane (wole chip)
49  Xh uu, uut, vv, vvt; // xdeformation, xdeform_test-func, ydeformation, ydeform_test-
        func
50
51  fespace Vv(Tv,P2); // for Oyz slice
52  Vv vz,wz,vzt,wzt; //speed_along_main-flow, speedz
53  Vv shrvzglobx,shrvzglobz; //shear-stress_along-flow, shear-stress_alongz
54  Vv shrvxz,shrvyz; // Trunc to cell vicinity shear-stress_along-flow, shear-
        stress_alongz
55
56  fespace VVv(Tv,P1); // for Oyz slice
57  VVv pz,pzt; // pressure, pressure_test-func %%%%%%%%%% unit kPa
58
59  fespace Xv(Tv,P2);
60  Xv rr, rrt, ww, wwt; // xdeformation, xdeform_test-func, zdeformation, zdeform_test-
        func
61
62  // Flow rate boundary conditions
63  real ux1 =q1/(60000*ch1);
64  real ux2 =cos(theta)*q2/(60000*ch2) ;
65  real vy2 =sin(theta)*q2/(60000*ch2) ;
66  real ux3 =cos(theta)*q3/(60000*ch2) ;
67  real vy3 =sin(theta)*q3/(60000*ch2) ;
68
69  real ux21 =cos(theta)*q2/(60000*ch2) ;
70  real vy21 =sin(theta)*q2/(60000*ch2) ;
71  real ux31 =cos(theta)*q3/(60000*ch2) ;
72  real vy31 =sin(theta)*q3/(60000*ch2) ;
73
74  real ux22 =cos(theta)*q2/(60000*ch2) ;
75  real vy22 =sin(theta)*q2/(60000*ch2) ;
76  real ux32 =cos(theta)*q3/(60000*ch2) ;
77  real vy32 =sin(theta)*q3/(60000*ch2) ;
78
79  real deb10,deb11,deb12,deb13,deb14,deb15,deb16; //border flowrate check
80  real dec= 1; // cell shift
81  real velcx,velcy; // speed at cell position
82
83  // biocell representation and AuNP
84  clust = 10*exp(-10*((x-xc)^2 + (y - yc)^2)/Rc^2)/Rc^2; //reference
85  c = clust; //effective tracking
86  cp = clust; //trajectory mapping
```

```
87  np = exp(-((x-xnp)^2 + (y - ynp)^2)/0.07^2)/0.07^2; // nanopartz
88
89  //fluid viscosity cell elasticity
90  real E = 1; //module d'Young HeLa cells  1-10 kPa
91  real nupoiss = 0.55; //poisson coef dimensioneless HeLa cells' nucleus 0.37+-0.03
92  real coef = 1; // unknown ref_ff++ 0.2
93  real muvisc = 1e-3; // unit mm/ms^2 %%%%% 1 Pa.ms H200
94
95  // Macro for cell deformation
96  real sqrt2 = sqrt(2.);
97  macro epsilon(u1, u2) [dx(u1), dy(u2), (dy(u1)+dx(u2))/sqrt2] //
98  macro div(u1, u2) (dx(u1) + dy(u2)) //
99
100
101 // Problem (solid)
102 real mu =E/(2*(1+nupoiss)); //MODULE DE COMPRESION  50;//10-100;//
103 real lambda =E*nupoiss/((1+nupoiss)*(1-2*nupoiss));  // MODULE ELASTIQUE 13;//5-20://
104
105 cout <<"Defining the weak formulation"<< endl;
106
107 ////////////////////////////////////////////////////////////////////////
108 // Steady state stokes for init vals in chip
109 problem stoinit([u,v,p],[ut,vt,pt]) =
110   int2d(Th,optimize=0)(
111             dx(p)*ut + (dx(u)*dx(ut) + dy(u)*dy(ut))
112             + dy(p)*vt + (dx(v)*dx(vt) + dy(v)*dy(vt))
113             + dx(u)*pt + dy(v)*pt -(1e-6)*p*pt)
114   + on(16,u=0,v=0)
115   + on(11,u=ux2,v=vy2)
116   + on(12,u=ux2,v=-vy2)
117   + on(13,u=ux3,v=-vy3)
118   + on(14,u=ux3,v=vy3)
119   + on(10,u=ux1,v=0)
120   + on(15,p=0);
121
122 // Elasticity problem in Oxy plane
123 solve elastplanxy0 ([uu, vv], [uut, vvt])
124   = int2d(Ch)(
125       lambda*div(uut,vvt)*div(uu,vv)
126       + 2.*mu*(epsilon(uut,vvt)'*epsilon(uu,vv))
127       )
128   + on(181,uu=x,vv=y);
129 cout << "Check Elastplanxy0 Init" << " " << uu[].max << " " << vv[].max << " " <<uut
      [].max <<" "<<vvt[].min << endl ;
130
131 ////////////////////////////////////////////////////////////////////////
132 // steady state stokes for s vertical slice
133 problem stovert([vz,wz,pz],[vzt,wzt,pzt]) =
134   int2d(Tv,optimize=0)(
```

```
            dx(pz)*vzt + (dx(vz)*dx(vzt) + dy(vz)*dy(vzt))
            + dy(pz)*wzt + (dx(wz)*dx(wzt) + dy(wz)*dy(wzt))
            + dx(vz)*pzt + dy(wz)*pzt -(1e-6)*pz*pzt)
  + on(6,vz=0,wz=0)
  + on(1,vz=sqrt(velcx^2+velcy^2))
  + on(5,pz=0);

// Elasticity problem in Oyz plane
solve elastplanyz0 ([rr, ww], [rrt, wwt])
  = int2d(Tv)(
      lambda*div(rrt,wwt)*div(rr,ww)
      + 2.*mu*(epsilon(rrt,wwt)'*epsilon(rr,ww))
      )
  + on(1,6,5,182,rr=x,ww=y);
cout << "Check Elastplanyz0 Init" << " " << rr[].max << " " << ww[].max << " " <<rrt
    [].max <<" "<<wwt[].min << endl ;

////////////////////////////////////////////////////////////////////////
// Temporal stokes for time step in chip
problem nstempo([u,v,p],[ut,vt,pt]) =
  int2d(Th,optimize=0)(
            dx(p)*ut + (dx(u)*dx(ut) + dy(u)*dy(ut))
            + dy(p)*vt + (dx(v)*dx(vt) + dy(v)*dy(vt))
            + dx(u)*pt + dy(v)*pt
            - (1e-10)*p*pt)
  - int2d(Th,optimize=0)(
              ut*(uold/dt - uold*dx(uold) - vold*dy(uold))
              + vt*(vold/dt-uold*dx(vold)-vold*dy(vold)))
  + on(10,u=ux1,v=0)
  + on(11,u=ux21,v=vy21)
  + on(12,u=ux22,v=-vy22)
  + on(13,u=ux31,v=-vy31)
  + on(14,u=ux32,v=vy32)
  + on(15,p=0)
  + on(16,u=0,v=0);

// Problem solving
cout <<"Launching solver"<< endl;
stoinit;
cout << "Check Stokes Init" << " " << u[].max << " " << v[].max << " " <<p[].max <<"
    "<<p[].min << endl ;
cout <<"Solution initiated"<< endl;

time = 0;
dt = 2; //2
Nitconv = 4;
/////
///////
/////////
```

```
// Time iteration for Tempo-stokes -> Convect cell probe -> elasticity in plane Oxy
    -> elasticity in plane Oyz
for (int  i=1; i<=400;i=i+1) {
  ////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////
  ////////////////////// FLOW MAIN CHIP
  ////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////
  // Boundary conditions and last iter values
  uold = u;
  vold = v;
  ux1 = ux1 + dec/(60000*ch2)*(i%11 == 1);
  ux32 = ux32 - dec*cos(theta)/(60000*ch2)*(i%11 == 1);
  vy32 = vy32 - dec*sin(theta)/(60000*ch2)*(i%11 == 1);
  // Updating velocity field
  nstempo;

  // Time shift
  time = time + dt;

  // Cell phase update
  for (int j=1; j<=Nitconv; j=j+1) {
    npold = np;
    cold = c;
    cpold = cp;
    c = convect([u,v],-dt*dt/4,cold); //0.5 //0.25
    cp = convect([u,v],-dt*dt/4,cpold); //0.5 //0.25
    np = convect([u,v],-dt*dt/4,npold);
  }

  // Cell track function location
  posx=x;
  posy=y;
  int indxCmax = c[].imax;
  real[int] poslcx = posx[];
  real[int] poslcy = posy[];
  probx = poslcx(indxCmax);
  proby = poslcy(indxCmax);

  probe = exp(-10*((x-probx)^2 + (y - proby)^2)/(2*Rc^2))/(Rc*sqrt(2*pi));

  ////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////
  ////////////////////// STRESS MAIN CHIP
  ////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////
  // Mechanical stress setting at cell phase position
  shearx = muvisc*dx(u);
  sheary = muvisc*dy(v);

  real[int] shlocx = shearx[];
  real[int] shlocy = sheary[];

```

```
230     cout << " " << posx[].n  << " " << posy[].n << " " << poslcx.n  << " " << poslcy.n
            << " " << c[].n << " " << shlocx.n << endl;
231
232
233     real[int] shearc = shearx[];
234     Xh taux = shlocx(indxCmax);
235     Xh tauy = shlocy(indxCmax);
236
237     // Computing shear stress effect
238     Xh sigxy11, sigxy22, sigxy12;
239     Xh uu1=uu, vv1=vv;
240     sigxy11([x+uu,y+vv]) = 2*taux;//(2*dx(u));
241     sigxy22([x+uu,y+vv]) = 2*tauy;//(2*dy(v));
242     sigxy12([x+uu,y+vv]) = taux+tauy;//(dx(u) + dy(v));
243
244     solve ElasticityXY ([uu, vv], [uut, vvt], init=i)
245       = int2d(Ch)(
246               lambda*div(uut,vvt)*div(uu,vv)
247               + 2.*mu*(epsilon(uut,vvt)'*epsilon(uu,vv))
248               )
249       + int1d(Ch, 181)(
250                     - coef*(sigxy11*N.x*uut + sigxy22*N.y*vvt + sigxy12*(N.y*uut+N.x*vvt
                          ))
251                     );
252
253     /*mesh Ch1*/ Ch = movemesh(Ch, [x+uu, y+vv]);
254     mesh Ch1 = Ch;
255     cout << "Displacement field "<<uu[].max << " " << vv[].max << endl;
256     cout << " Local shear stress " << taux[].max << " " << tauy[].max << endl;
257     ////////////////////////////////////////////////////////////////////////////
258     ////////////////// FLOW AND STRESS IN LOCAL SLICE
259     ////////////////////////////////////////////////////////////////////////////
260     // Boundary conditions and local values
261     velcx = u(probx,proby);
262     velcy = v(probx,proby);
263     // computing velocity field
264     stovert;
265
266     // computing shear stress
267     shrvzglobx = muvisc*dx(vz);
268     shrvzglobz = muvisc*dy(wz);
269     shrvxz = shrvzglobx;//*((x^2 + y^2)<=2*Rc^2);//(abs(x)<=2.5*Rc)*(abs(y)<=3*Rc); //
            muvisc*dy(wz);
270     shrvyz = shrvzglobz;//*((x^2 + y^2)<=2*Rc^2);//(abs(x)<=2.5*Rc)*(abs(y)<=3*Rc);
271     // assuming cell centered in slice
272     real tazx = shrvxz[].max;//(0,Rc)
273     real tazy = shrvyz[].max;//(0,Rc)
274
275     // Computing shear stress effect
```

```
276   Xv sigyz11, sigyz22, sigyz12;
277   Xv rr1=rr, ww1=ww;
278   sigyz11([x+rr,y+ww]) =2*shrvxz+2*taux;//2*tazy;//2*shrvxz-p;//
279   sigyz22([x+rr,y+ww]) =2*shrvyz;//2*tazx;//2*shrvyz-p;//
280   sigyz12([x+rr,y+ww]) =shrvxz+shrvyz+taux;//tazx + tazy;//
281
282   solve ElasticityYZ ([rr, ww], [rrt, wwt], init=i)
283     = int2d(Tv)(
284             lambda*div(rrt,wwt)*div(rr,ww)
285             + 2.*mu*(epsilon(rrt,wwt)'*epsilon(rr,ww))
286             )
287     + int1d(Tv, 182)(
288                   - coef*(sigyz11*N.x*rrt + sigyz22*N.y*wwt + sigyz12*(N.y*rrt+N.x*wwt
                          ))
289                   )
290     +on(1,5,6,rr=0,ww=0);
291
292   /*mesh Tv1*/Tv = movemesh(Tv, [x+rr, y+ww]);
293   mesh Tv1 = Tv;
294   cout << "Displacement field in the vertical slice "<<rr[].max << " " << ww[].max <<
        endl;
295   cout << " Local shear stress " << tazx << " " << tazy << " Stress global max " <<
       shrvzglobx[].max  << " " << shrvzglobz[].max<< endl;
296   ////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////
297   ////////////////////// CELL TRAFFIC UPDATE
298   ////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////
299   // inject a cell if the last one is out
300   if (probx>=probxold || proby >=probyold){
301     c = c;
302     probxold = probx;
303     probyold = proby;
304   }
305   else{
306     c= clust;
307     probxold = xcref-0.3;
308     probyold = ycref-0.3;
309   }
310   cp = cp + clust*(i%7==1); //i%9==1
311   np = np  + 2*exp(-((x-xnp)^2 + (y - ynp)^2)/0.07^2)/0.07^2;
312
313   cout << "Iteration at " << time << " " << u[].max << " " << u[].min << " " <<taux
       [].max <<" "<<tauy[].max << endl ;
314   cout << " Cell phase max " << c[].max << " " << indxCmax << " " << " " << c[].n <<
       " " << endl ;
315   cout << "   Cell phase position " << poslcx(indxCmax) << " " << poslcy(indxCmax) <<
        " " << " "  << " " << endl ;
316   cout << "     Velocity and pressure at cell position " << velcx << " " << velcy <<
       " " << p(probx,proby)  << endl ;
317
```

```
318     // Flow rate check at borders of chip
319     deb10=int1d(Th,10)(sqrt(u^2 + v^2))*2*Hc*(60000);deb11=int1d(Th,11)(sqrt(u^2 + v^2)
            )*2*Hc*(60000);deb12=int1d(Th,12)(sqrt(u^2 + v^2))*2*Hc*(60000);deb13=int1d(Th
            ,13)(sqrt(u^2 + v^2))*2*Hc*(60000);deb14=int1d(Th,14)(sqrt(u^2 + v^2))*2*Hc
            *(60000);deb15=int1d(Th,15)(sqrt(u^2 + v^2))*2*Hc*(60000);deb16=int1d(Th,16)(
            sqrt(u^2 + v^2))*2*Hc*(60000);
320     cout << " " << deb10  << " " << deb11  << " " << deb12 << " " << deb13  << " " <<
            deb14  << " " << deb15  << " " << deb16 << endl;
321
322     //Th = adaptmesh(Th,cp,np,hmin=0.01,hmax=0.04);
323     Th = adaptmesh(Th,cp,np,hmin=0.0075,hmax=0.02);
324
325     plot(Th);
326     plot(Th,cp,np, fill=true,value=false);
327     plot(Th,probe, fill=true);
328     plot(Th,[shearx,sheary], fill=true,value=true);
329     plot(Ch,[uu,vv],wait=false);
330     plot(Tv1,[vz,wz],[rr,ww],pz,wait=false, fill=false);
331     savevtk("solution_horiz."+Inst+"timestamp"+i+".vtu",Th,[u,v],p,cp,np,[shearx,sheary
            ],probe,
332             dataname="Velocity Pressure Cell-phase AuNP-phase Shear_stress cell_track
                ");
333     savevtk("Deformat_horiz."+Inst+"timestamp"+i+".vtu",Ch1,[uu,vv],[sigxy11,sigxy22,
            sigxy12],dataname="Displacement_field tensor_strain");
334     savevtk("Solution_verti."+Inst+"timestamp"+i+".vtu",Tv,[vz,wz],p,[shrvxz,shrvyz],
            dataname="Velocity Pressure Shear_stress");
335     savevtk("Deformat_verti."+Inst+"timestamp"+i+".vtu",Tv1,[rr,ww],[sigyz11,sigyz22,
            sigyz12],dataname="Displacement_field tensor_strain");
336   }
337
338   cout <<"Solver done!"<< endl;
339   cout <<"--CPU Time for Stokes solver:" << clock()-cpu << endl;
340   //plots
341   cout <<"Solution saved"<< endl;
342
343   return Th;
344 }
```

ANNEXE H

PUBLICATION

- Brevet “Method and device to provide a microfluidic flow” soumi, identification EP19172343.6

BIBLIOGRAPHIE

[1] J. Gómez-Navarro, D. Curiel, and J. Douglas, "Gene therapy for cancer," *European Journal of Cancer*, vol. 35, no. 14, pp. 2039–2057, 1999.

[2] R. Scollay, "Gene therapy : a brief overview of the past, present, and future," *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 953, no. 1, pp. 26–30, 2001.

[3] W. F. Anderson, "Human gene therapy," *Nature.*, vol. 392, no. 6679 SUPPL., pp. 25–30, 1998.

[4] D. W. Pack, A. S. Hoffman, S. Pun, and P. S. Stayton, "Design and development of polymers for gene delivery," *Nature Reviews Drug Discovery*, vol. 4, pp. 581–593, July 2005.

[5] M. Belting, S. Sandgren, and A. Wittrup, "Nuclear delivery of macromolecules : Barriers and carriers," *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 57, no. 4 SPEC.ISS., pp. 505–527, 2005. cited By 164.

[6] M. Miaczynska and H. Stenmark, "Mechanisms and functions of endocytosis ," *The Journal of Cell Biology*, vol. 180, pp. 7–11, 01 2008.

[7] C. Pichon, L. Billiet, and P. Midoux, "Chemical vectors for gene delivery : Uptake and intracellular trafficking," *Curr Opin Biotechnol*, vol. 21, no. 5, pp. 640–645, 2010. cited By 127.

[8] J. Fraire, G. Houthaeve, J. Liu, L. Raes, L. Vermeulen, S. Stremersch, T. Brans, G. García-Díaz Barriga, S. De Keulenaer, F. Van Nieuwerburgh, R. De Rycke, J. Vandesompele, P. Mestdagh, K. Raemdonck, W. De Vos, S. De Smedt, and K. Braeckmans, "Vapor nanobubble is the more reliable photothermal mechanism for inducing endosomal escape of sirna without disturbing cell homeostasis," *Journal of Controlled Release*, vol. 319, pp. 262–275, 2020. cited By 1.

[9] L. I. Selby, C. M. Cortez-Jugo, G. K. Such, and A. P. Johnston, "Nanoescapology : progress toward understanding the endosomal escape of polymeric nanoparticles," *Wiley Interdisciplinary Reviews : Nanomedicine and Nanobiotechnology*, vol. 9, no. 5, p. e1452, 2017.

[10] W. Doolittle, "Lateral genomics," *Trends in Cell Biology*, vol. 9, no. 12, pp. M5–M8, 1999. cited By 247.

[11] C. Woese, "The universal ancestor," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 95, no. 12, pp. 6854–6859, 1998. cited By 690.

[12] C. Woese, "On the evolution of cells," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 99, no. 13, pp. 8742–8747, 2002. cited By 466.

[13] A. Varkouhi, M. Scholte, G. Storm, and H. Haisma, "Endosomal escape pathways for delivery of biologicals," *Journal of Controlled Release*, vol. 151, no. 3, pp. 220–228, 2011. cited By 850.

[14] O. Donnelly, K. Harrington, A. Melcher, and H. Pandha, "Live viruses to treat cancer," *Journal of the Royal Society of Medicine*, vol. 106, no. 8, pp. 310–314, 2013. cited By 17.

[15] C. Thomas, A. Ehrhardt, and M. Kay, "Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy," *Nat Rev Genet*, vol. 4, no. 5, pp. 346–358, 2003. cited By 1608.

[16] M. Cloyd, *Medical Microbiology. 4th edition.*, ch. Chapter 62 : Human Retroviruses, p. 0. Galveston (TX) : University of Texas Medical Branch at Galveston, 1996.

[17] W. Doerfler, *Medical Microbiology. 4th edition.*, ch. Chapter 67 : Adenoviruses, p. 0. Galveston (TX) : University of Texas Medical Branch at Galveston, 1996.

[18] T. FIREDMANN, "La thérapie génique, promesses et limites," *Pour la science*, no. 241, pp. 60–65, 1997.

[19] D. Bouard, N. Alazard-Dany, and F.-L. Cosset, "Viral vectors : from virology to transgene expression," *British Journal of Pharmacology*, vol. 157, no. 2, pp. 153–165, 2009.

[20] D. Lechardeur and G. L. Lukacs, "Intracellular barriers to non-viral gene transfer," *Current gene therapy*, vol. 2, no. 2, pp. 183–194, 2002.

[21] D. Lechardeur, A. Verkman, and G. L. Lukacs, "Intracellular routing of plasmid dna during non-viral gene transfer," *Advanced drug delivery reviews*, vol. 57, no. 5, pp. 755–767, 2005.

[22] N. Helal, A. Osami, A. Helmy, T. McDonald, L. Shaaban, and M. Nounou, "Non-viral gene delivery systems : Hurdles for bench-to-bedside transformation," *Pharmazie*, vol. 72, no. 11, pp. 627–651, 2017. cited By 4.

[23] L. Yan, J. Zhang, C.-S. Lee, and X. Chen, "Micro- and nanotechnologies for intracellular delivery," *Small*, vol. 10, no. 22, pp. 4487–4504, 2014. cited By 40.

[24] T. Thomas, H.-A. Tajmir-Riahi, and C. Pillai, "Biodegradable polymers for gene delivery," *Molecules*, vol. 24, no. 20, 2019. cited By 0.

[25] J. Meacham, K. Durvasula, F. Degertekin, and A. Fedorov, "Physical methods for intracellular delivery : Practical aspects from laboratory use to industrial-scale processing," *Journal of Laboratory Automation*, vol. 19, no. 1, pp. 1–18, 2014. cited By 55.

[26] S. Yan, H. Huang, L. Chen, X. Gao, and Y. Li, "Cell microinjection device suitable for curved needle based on triangular flexible mechanism," in *2018 IEEE International Conference on Robotics and Biomimetics (ROBIO)*, pp. 946–952, Dec 2018.

[27] S. Graf, T. Madigou, R. Li, C. Chesné, A. Stemmer, and H. Knapp, "Fully automated microinjection system for xenopus laevis oocytes with integrated sorting and collection," *Journal of Laboratory Automation*, vol. 16, no. 3, pp. 186–196, 2011. cited By 8.

[28] M. Abbaci, M. Barberi-Heyob, W. Blondel, F. Guillemin, and D. J, "Advantages and limitations of commonly used methods to assay the molecular permeability of gap junctional intercellular communication," *BioTechniques*, vol. 145, no. 1, pp. 33–62, 2008.

[29] P. Kallio and J. Kuncová-Kallio, "Capillary pressure microinjection of living adherent cells : Challenges in automation," *Journal of Micromechatronics*, vol. 3, no. 3, pp. 189–220, 2006. cited By 23.

[30] W. Ansorge and R. Pepperkok, "Performance of an automated system for capillary microinjection into living cells," *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, vol. 16, no. 4, pp. 283–292, 1988. cited By 64.

[31] A. Adamo, O. Roushdy, R. Dokov, A. Sharei, and K. Jensen, "Microfluidic jet injection for delivering macromolecules into cells," *Journal of Micromechanics and Microengineering*, vol. 23, no. 3, 2013. cited By 11.

[32] P. Furth, A. Shamay, and L. Hennighausen, "Gene transfer into mammalian cells by jet injection," *Hybridoma*, vol. 14, no. 2, pp. 149–152, 1995. cited By 49.

[33] P. Furth, A. Shamay, R. Wall, and L. Hennighausen, "Gene transfer into somatic tissues by jet injection," *Analytical Biochemistry*, vol. 205, no. 2, pp. 365–368, 1992. cited By 59.

[34] C. Plank, U. Schillinger, F. Scherer, C. Bergemann, J.-S. Rémy, F. Krötz, M. Anton, J. Lausier, and J. Rosenecker, "The magnetofection method : Using magnetic force to enhance gene delivery," *Biological Chemistry*, vol. 384, no. 5, pp. 737–747, 2003. cited By 316.

[35] L. López-Marín, A. Rivera, F. Fernández, and A. Loske, "Shock wave-induced permeabilization of mammalian cells," *Phys Life Rev*, vol. 26-27, pp. 1–38, 2018. cited By 8.

[36] J. Dobson, "Gene therapy progress and prospects : magnetic nanoparticle-based gene delivery," *Gene Therapy*, vol. 13, pp. 283–287, Feb. 2006.

[37] F. Scherer, M. Anton, U. Schillinger, J. Henke, C. Bergemann, A. Krüger, B. Gänsbacher, and C. Plank, "Magnetofection : enhancing and targeting gene delivery by magnetic force in vitro and in vivo," *Gene Therapy*, vol. 9, pp. 102–109, Jan. 2002.

[38] J. Gehl, "Electroporation : Theory and methods, perspectives for drug delivery, gene therapy and research," *Acta Physiologica Scandinavica*, vol. 177, no. 4, pp. 437–447, 2003. cited By 572.

[39] C. Favard, D. Dean, and M.-P. Rols, "Electrotransfer as a non viral method of gene delivery," *Curr Gene Ther*, vol. 7, no. 1, pp. 67–77, 2007. cited By 81.

[40] B. Rubinsky, "Irreversible electroporation in medicine," *Technology in Cancer Research and Treatment*, vol. 6, no. 4, pp. 255–259, 2007. cited By 263.

[41] J. Weaver, "Electroporation : A general phenomenon for manipulating cells and tissues," *Journal of Cellular Biochemistry*, vol. 51, no. 4, pp. 426–435, 1993. cited By 381.

[42] P. Boukany, A. Morss, W.-C. Liao, B. Henslee, H. Jung, X. Zhang, B. Yu, X. Wang, Y. Wu, L. Li, K. Gao, X. Hu, X. Zhao, O. Hemminger, W. Lu, G. Lafyatis, and L. Lee, "Nanochannel electroporation delivers precise amounts of biomolecules into living cells," *Nature Nanotechnology*, vol. 6, no. 11, pp. 747–754, 2011. cited By 195.

[43] X. Xie, A. Xu, S. Leal-Ortiz, Y. Cao, C. Garner, and N. Melosh, "Nanostraw-electroporation system for highly efficient intracellular delivery and transfection," *ACS Nano*, vol. 7, no. 5, pp. 4351–4358, 2013. cited By 158.

[44] C.-H. Wang, Y.-H. Lee, H.-T. Kuo, W.-F. Liang, W.-J. Li, and G.-B. Lee, "Dielectrophoretically-assisted electroporation using light-activated virtual microelectrodes for multiple dna transfection," *Lab Chip*, vol. 14, no. 3, pp. 592–601, 2014. cited By 20.

[45] D. Hallow, R. Seeger, P. Kamaev, G. Prado, M. LaPlaca, and M. Prausnitz, "Shear-induced intracellular loading of cells with molecules by controlled microfluidics," *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 99, no. 4, pp. 846–854, 2008. cited By 46.

[46] M. Kizer, Y. Deng, G. Kang, P. Mikael, X. Wang, and A. Chung, "Hydroporator : A hydrodynamic cell membrane perforator for high-throughput vector-free nanomaterial intracellular delivery and dna origami biostability evaluation," *Lab on a Chip*, vol. 19, no. 10, pp. 1747–1754, 2019. cited By 6.

[47] C. Ha, S. Lee, S. Kim, J. Chung, H. Bae, and K. Kwon, "Novel mechanism of gene transfection by low-energy shock wave," *Sci Rep*, vol. 5, 2015. cited By 3.

[48] M. Wang, Y. Zhang, C. Cai, J. Tu, X. Guo, and D. Zhang, "Sonoporation-induced cell membrane permeabilization and cytoskeleton disassembly at varied acoustic and microbubble-cell parameters," *Scientific Reports*, vol. 8, no. 1, 2018. cited By 12.

[49] R. Karshafian, P. Bevan, R. Williams, S. Samac, and P. Burns, "Sonoporation by ultrasound-activated microbubble contrast agents : Effect of acoustic exposure parameters on cell membrane permeability and cell viability," *Ultrasound in Medicine and Biology*, vol. 35, no. 5, pp. 847–860, 2009. cited By 220.

[50] S. Rodamporn, N. Harris, S. Beeby, R. Boltryk, and T. Sanchez-Elsner, "Hela cell transfection using a novel sonoporation system," *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, vol. 58, no. 4, pp. 927–934, 2011. cited By 19.

[51] D. J. Stevenson, F. J. Gunn-Moore, P. Campbell, and K. Dholakia, "Single cell optical transfection," *Journal of the Royal Society, Interface*, vol. 7, pp. 863–871, June 2010.

[52] M. Berns, W. Wright, and R. Steubing, "Laser microbeam as a tool in cell biology," *International Review of Cytology*, vol. 129, no. C, pp. 1–44, 1991. cited By 97.

[53] A. Vogel, J. Noack, G. Hüttman, and G. Paltauf, "Mechanisms of femtosecond laser nanosurgery of cells and tissues," *Applied Physics B : Lasers and Optics*, vol. 81, no. 8, pp. 1015–1047, 2005. cited By 999.

[54] V. Venugopalan, A. Guerra, K. Nahen, and A. Vogel, "Role of laser-induced plasma formation in pulsed cellular microsurgery and micromanipulation," *Physical Review Letters*, vol. 88, no. 7, pp. 781031–781034, 2002. cited By 170.

[55] P. A. Quinto-Su and V. Venugopalan, "Mechanisms of laser cellular microsurgery," in *Laser Manipulation of Cells and Tissues*, vol. 82 of *Methods in Cell Biology*, pp. 111 – 151, Academic Press, 2007.

[56] R. Xiong, S. Samal, J. Demeester, A. Skirtach, S. De Smedt, and K. Braeckmans, "Laser-assisted photoporation : fundamentals, technological advances and applications," *Advances in Physics : X*, vol. 1, no. 4, pp. 596–620, 2016. cited By 23.

[57] C. Peng, R. Palazzo, and I. Wilke, "Laser intensity dependence of femtosecond near-infrared optoinjection," *Physical Review E - Statistical, Nonlinear, and Soft Matter Physics*, vol. 75, no. 4, 2007. cited By 25.

[58] U. Tirlapur and K. König, "Femtosecond near-infrared laser pulses as a versatile non-invasive tool for intratissue nanoprocessing in plants without compromising viability," *Plant Journal*, vol. 31, no. 3, pp. 365–374, 2002. cited By 121.

[59] J. Noack and A. Vogel, "Laser-induced plasma formation in water at nanosecond to femtosecond time scales : calculation of thresholds, absorption coefficients, and energy density," *IEEE Journal of Quantum Electronics*, vol. 35, no. 8, pp. 1156–1167, 1999. cited By 418.

[60] E. Y. Lukianova-Hleb, Y.-S. Kim, I. Belatsarkouski, A. M. Gillenwater, B. E. O'Neill, and D. O. Lapotko, "Intraoperative diagnostics and elimination of residual microtumours with plasmonic nanobubbles," *Nature Nanotechnology*, vol. 11, pp. 525–532, June 2016.

[61] H. Raether, "Surface plasmons on smooth surfaces," in *Surface plasmons on smooth and rough surfaces and on gratings*, pp. 4–39, Springer, 1988.

[62] J. R. Sambles, G. W. Bradbery, and F. Yang, "Optical excitation of surface plasmons : An introduction," *Contemporary Physics*, vol. 32, no. 3, pp. 173–183, 1991.

[63] A. Polman and H. A. Atwater, "Plasmonics : optics at the nanoscale," *Materials Today*, vol. 8, no. 1, p. 56, 2005.

[64] I. R. Hooper and W. L. Barnes, "Chapter 2 - the basics of plasmonics," in *Modern Plasmonics* (N. Richardson and S. Holloway, eds.), vol. 4 of *Handbook of Surface Science*, pp. 37 – 74, North-Holland, 2014.

[65] S. Eustis and M. A. El-Sayed, "Why gold nanoparticles are more precious than pretty gold : Noble metal surface plasmon resonance and its enhancement of the radiative and nonradiative properties of nanocrystals of different shapes," *Chemical Society Reviews*, vol. 35, 2006.

[66] E. Boulais, R. Lachaine, A. Hatef, and M. Meunier, "Plasmonics for pulsed-laser cell nanosurgery : Fundamentals and applications," *Journal of Photochemistry and Photobiology C : Photochemistry Reviews*, vol. 17, pp. 26–49, 2013. cited By 78.

[67] J. Quinn, "Bulk and surface plasmons in solids," *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B : Beam Interactions with Materials and Atoms*, vol. 96, no. 3, pp. 460 – 464, 1995. The Interaction of Swift Particles and Electromagnetic Fields with Matter.

[68] L. C. Oliveira and A. M. Nogueira Lima, "Radiative and non-radiative surface plasmon resonance : Comparison of real-time sensing performance," *Plasmonics*, pp. 1–8, 2020.

[69] S. Link and M. A. El-Sayed, "Spectral properties and relaxation dynamics of surface plasmon electronic oscillations in gold and silver nanodots and nanorods," *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 103, no. 40, pp. 8410–8426, 1999.

[70] X. Li, Z. Hu, J. Ma, X. Wang, Y. Zhang, W. Wang, and Z. Yuan, "The systematic evaluation of size-dependent toxicity and multi-time biodistribution of gold nanoparticles," *Colloids and Surfaces B : Biointerfaces*, vol. 167, pp. 260–266, 2018. cited By 18.

[71] R. Xiong, K. Raemdonck, K. Peynshaert, I. Lentacker, I. De Cock, J. Demeester, S. De Smedt, A. Skirtach, and K. Braeckmans, "Comparison of gold nanoparticle mediated photoporation : Vapor nanobubbles outperform direct heating for delivering macromolecules in live cells," *ACS Nano*, vol. 8, no. 6, pp. 6288–6296, 2014. cited By 71.

[72] T. Labouret, J.-F. Audibert, R. B. Pansu, and B. Palpant, "Plasmon-assisted production of reactive oxygen species by single gold nanorods," *Small*, vol. 11, no. 35, pp. 4475–4479, 2015.

[73] E. Lukianova-Hleb, A. Volkov, and D. Lapotko, "Laser pulse duration is critical for the generation of plasmonic nanobubbles," *Langmuir*, vol. 30, no. 25, pp. 7425–7434, 2014. cited By 27.

[74] A. Davis, M. Farrar, N. Nishimura, M. Jin, and C. Schaffer, "Optoporation and genetic manipulation of cells using femtosecond laser pulses," *Biophysical Journal*, vol. 105, no. 4, pp. 862–871, 2013. cited By 35.

[75] H. Rendall, R. Marchington, B. Praveen, G. Bergmann, Y. Arita, A. Heisterkamp, F. Gunn-Moore, and K. Dholakia, "High-throughput optical injection of mammalian cells using a bessel light beam," *Lab on a Chip*, vol. 12, no. 22, pp. 4816–4820, 2012. cited By 21.

[76] A. Dagallier, E. Boulais, C. Boutopoulos, R. Lachaine, and M. Meunier, "Multiscale modeling of plasmonic enhanced energy transfer and cavitation around laser-excited nanoparticles," *Nanoscale*, vol. 9, no. 9, pp. 3023–3032, 2017. cited By 10.

[77] K. Rau, P. Quinto-Su, A. Hellman, and V. Venugopalan, "Pulsed laser microbeam-induced cell lysis : Time-resolved imaging and analysis of hydrodynamic effects," *Biophysical Journal*, vol. 91, no. 1, pp. 317–329, 2006. cited By 121.

[78] E. Lukianova-Hleb, Y. Hu, L. Latterini, L. Tarpani, S. Lee, R. Drezek, J. Hafner, and D. Lapotko, "Plasmonic nanobubbles as transient vapor nanobubbles generated around plasmonic nanoparticles," *ACS Nano*, vol. 4, no. 4, pp. 2109–2123, 2010. cited By 232.

[79] K. Johansen, J. Song, K. Johnston, and P. Prentice, "Deconvolution of acoustically detected bubble-collapse shock waves," *Ultrasonics*, vol. 73, pp. 144–153, 2017. cited By 15.

[80] M. Hutson and X. Ma, "Plasma and cavitation dynamics during pulsed laser microsurgery in vivo," *Physical Review Letters*, vol. 99, no. 15, 2007. cited By 56.

[81] M. Kitz, S. Preisser, A. Wetterwald, M. Jaeger, G. N. Thalmann, and M. Frenz, "Vapor bubble generation around gold nano-particles and its application to damaging of cells," *Biomed Opt Express*, vol. 2, pp. 291–304, Feb 2011.

[82] E.-A. Brujan, "Stress wave emission from plasmonic nanobubbles," *Journal of Physics D : Applied Physics*, vol. 50, p. 015304, nov 2016.

[83] Y. Arita, M. Antkowiak, V. Venugopalan, F. Gunn-Moore, and K. Dholakia, "Dynamics of primary and secondary microbubbles created by laser-induced breakdown of an optically trapped nanoparticle," *Physical Review E - Statistical, Nonlinear, and Soft Matter Physics*, vol. 85, no. 1, 2012. cited By 8.

[84] K. Santo and M. Berkowitz, "Shock wave interaction with a phospholipid membrane : Coarse-grained computer simulations," *J Chem Phys*, vol. 140, no. 5, 2014. cited By 16.

[85] D. McAuliffe, L. Shun, T. Flotte, and A. Doukas, "Stress-wave-assisted transport through the plasma membrane in vitro," *Lasers Surg Med*, vol. 20, no. 2, pp. 216–222, 1997. cited By 43.

[86] P. Birkin, D. Offin, P. Joseph, and T. Leighton, "Cavitation, shock waves and the invasive nature of sonoelectrochemistry," *J Phys Chem B*, vol. 109, no. 35, pp. 16997–17005, 2005. cited By 46.

[87] V. Ramalingam, "Multifunctionality of gold nanoparticles : Plausible and convincing properties," *Advances in Colloid and Interface Science*, vol. 271, 2019. cited By 0.

[88] X.-D. Zhang, H.-Y. Wu, Y.-Y. W. Di Wu, J.-H. Chang, Z.-B. Zhai, A.-M. Meng, P.-X. Liu, L.-A. Zhang, and F.-Y. Fan, "Toxicologic effects of gold nanoparticles in vivo by different administration routes," *International journal of nanomedicine*, vol. 5, p. 771, 2010.

[89] J. Li, D. Hartono, C.-N. Ong, B.-H. Bay, and L. Yung, "Autophagy and oxidative stress associated with gold nanoparticles," *Biomaterials*, vol. 31, no. 23, pp. 5996–6003, 2010. cited By 317.

[90] E. Connor, J. Mwamuka, A. Gole, C. Murphy, and M. Wyatt, "Gold nanoparticles are taken up by human cells but do not cause acute cytotoxicity," *Small*, vol. 1, no. 3, pp. 325–327, 2005. cited By 1777.

[91] J. Lin, H. Zhang, Z. Chen, and Y. Zheng, "Penetration of lipid membranes by gold nanoparticles : Insights into cellular uptake, cytotoxicity, and their relationship," *ACS Nano*, vol. 4, no. 9, pp. 5421–5429, 2010. cited By 376.

[92] S. Wang, W. Lu, O. Tovmachenko, U. Rai, H. Yu, and P. Ray, "Challenge in understanding size and shape dependent toxicity of gold nanomaterials in human skin keratinocytes," *Chemical Physics Letters*, vol. 463, no. 1-3, pp. 145–149, 2008. cited By 208.

[93] B. Klębowski, J. Depciuch, M. Parlińska-Wojtan, and J. Baran, "Applications of noble metal-based nanoparticles in medicine," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 19, no. 12, 2018. cited By 15.

[94] Y. Pan, S. Neuss, A. Leifert, M. Fischler, F. Wen, U. Simon, G. Schmid, W. Brandau, and W. Jahnen-Dechent, "Size-dependent cytotoxicity of gold nanoparticles," *Small*, vol. 3, no. 11, pp. 1941–1949, 2007. cited By 1142.

[95] K. Buyukhatipoglu and A. M. Clyne, "Superparamagnetic iron oxide nanoparticles change endothelial cell morphology and mechanics via reactive oxygen species formation," *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, vol. 96A, no. 1, pp. 186–195, 2011.

[96] D. Huang, H. Zhou, H. Liu, and J. Gao, "The cytotoxicity of gold nanoparticles is dispersity-dependent," *Dalton Transactions*, vol. 44, no. 41, pp. 17911–17915, 2015. cited By 11.

[97] K. Mortezaee, M. Najafi, H. Samadian, H. Barabadi, A. Azarnezhad, and A. Ahmadi, "Redox interactions and genotoxicity of metal-based nanoparticles : A comprehensive review," *Chemico-Biological Interactions*, vol. 312, 2019. cited By 12.

[98] M. Liu, Y. Zhao, and X. Zhang, "Knockdown of glutamate cysteine ligase catalytic subunit by sirna causes the gold nanoparticles-induced cytotoxicity in lung cancer cells," *PLoS ONE*, vol. 10, no. 3, 2015. cited By 10.

[99] M. Bhamidipati and L. Fabris, "Multiparametric assessment of gold nanoparticle cytotoxicity in cancerous and healthy cells : The role of size, shape, and surface chemistry," *Bioconjugate Chemistry*, vol. 28, no. 2, pp. 449–460, 2017. cited By 42.

[100] M. Yu, S. Huang, K. J. Yu, and A. M. Clyne, "Dextran and polymer polyethylene glycol (peg) coating reduce both 5 and 30 nm iron oxide nanoparticle cytotoxicity in 2d and 3d cell culture," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 13, no. 5, pp. 5554–5570, 2012.

[101] J. Lee, D. Lilly, C. Doty, P. Podsiadlo, and N. Kotov, "In vitro toxicity testing of nanoparticles in 3d cell culture," *Small*, vol. 5, no. 10, pp. 1213–1221, 2009. cited By 202.

[102] L. Yildirimer, N. Thanh, M. Loizidou, and A. Seifalian, "Toxicological considerations of clinically applicable nanoparticles," *Nano Today*, vol. 6, no. 6, pp. 585–607, 2011. cited By 337.

[103] G. Ajnai, A. Chiu, T. Kan, C.-C. Cheng, T.-H. Tsai, and J. Chang, "Trends of gold nanoparticle-based drug delivery system in cancer therapy," *Journal of Experimental and Clinical Medicine (Taiwan)*, vol. 6, no. 6, pp. 172–178, 2014. cited By 70.

[104] M. Lokhandwalla and B. Sturtevant, "Mechanical haemolysis in shock wave lithotripsy (swl) : I. analysis of cell deformation due to swl flow-fields," *Physics in Medicine and Biology*, vol. 46, no. 2, pp. 413–437, 2001. cited By 82.

[105] E. Brujan, "The role of cavitation microjets in the therapeutic applications of ultrasound," *Ultrasound in Medicine and Biology*, vol. 30, no. 3, pp. 381–387, 2004. cited By 89.

[106] P. Prentice, A. Cuschieri, K. Dholakia, M. Prausnitz, and P. Campbell, "Membrane disruption by optically controlled microbubble cavitation," *Nature Physics*, vol. 1, no. 2, pp. 107–110, 2005. cited By 420.

[107] Z. Li, A. Liu, E. Klaseboer, J. Zhang, and C. Ohl, "Single cell membrane poration by bubble-induced microjets in a microfluidic chip," *Lab on a Chip*, vol. 13, no. 6, pp. 1144–1150, 2013. cited By 33.

[108] T. Pylaev, E. Vanzha, E. Avdeeva, B. Khlebtsov, and N. Khlebtsov, "A novel cell transfection platform based on laser optoporation mediated by au nanostar layers," *J Biophotonics*, vol. 12, no. 1, 2019. cited By 4.

[109] N. Saklayen, M. Huber, M. Madrid, V. Nuzzo, D. Vulis, W. Shen, J. Nelson, A. McClelland, A. Heisterkamp, and E. Mazur, "Intracellular delivery using nanosecond-laser excitation of large-area plasmonic substrates," *ACS Nano*, vol. 11, no. 4, pp. 3671–3680, 2017. cited By 26.

[110] N. Saklayen, S. Kalies, M. Madrid, V. Nuzzo, M. Huber, W. Shen, J. Sinanan-Singh, D. Heinemann, A. Heisterkamp, and E. Mazur, "Analysis of poration-induced changes in cells from laser-activated plasmonic substrates," *Biomed. Opt. Express*, vol. 8, pp. 4756–4771, Oct 2017.

[111] Y. Arita, M. Ploschner, M. Antkowiak, F. Gunn-Moore, and K. Dholakia, "Single cell transfection by laser-induced breakdown of an optically trapped gold nanoparticle," in *Proceedings of SPIE - The International Society for Optical Engineering*, vol. 8972, 2014. cited By 3.

[112] E. Lukianova-Hleb, D. Wagner, M. Brenner, and D. Lapotko, "Cell-specific transmembrane injection of molecular cargo with gold nanoparticle-generated transient plasmonic nanobubbles," *Biomaterials*, vol. 33, no. 21, pp. 5441–5450, 2012. cited By 44.

[113] P. Tabeling and S. Chen, *Introduction to Microfluidics*. OUP Oxford, 2005.

[114] G.-B. Lee, C.-C. Chang, S.-B. Huang, and R.-J. Yang, "The hydrodynamic focusing effect inside rectangular microchannels," *Journal of Micromechanics and Microengineering*, vol. 16, pp. 1024–1032, apr 2006.

[115] M. A. Daniele, D. A. Boyd, D. R. Mott, and F. S. Ligler, "3d hydrodynamic focusing microfluidics for emerging sensing technologies," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 67, pp. 25 – 34, 2015. Special Issue : BIOSENSORS 2014.

[116] X. Ding, Z. Peng, S.-C. Lin, M. Geri, S. Li, P. Li, Y. Chen, M. Dao, S. Suresh, and T. Huang, "Cell separation using tilted-angle standing surface acoustic waves," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 111, no. 36, pp. 12992–12997, 2014. cited By 222.

[117] A. Ashkin, "Acceleration and trapping of particles by radiation pressure," *Physical Review Letters*, vol. 24, no. 4, pp. 156–159, 1970. cited By 3230.

[118] C. Liu and G. Hu, "High-throughput particle manipulation based on hydrodynamic effects in microchannels," *Micromachines*, vol. 8, no. 3, 2017.

[119] J. M. Martel and M. Toner, "Inertial focusing in microfluidics," *Annual Review of Biomedical Engineering*, vol. 16, no. 1, pp. 371–396, 2014. PMID : 24905880.

[120] N. Panwar, P. Song, S. C. Tjin, and K.-T. Yong, "Sheath-assisted hydrodynamic particle focusing in higher reynolds number flows," *Journal of Micromechanics and Microengineering*, vol. 28, p. 105018, aug 2018.

[121] C. Simonnet and A. Groisman, "Two-dimensional hydrodynamic focusing in a simple microfluidic device," *Applied Physics Letters*, vol. 87, no. 11, p. 114104, 2005.

[122] N. Sundararajan, M. S. Pio, L. P. Lee, and A. A. Berlin, "Three-dimensional hydrodynamic focusing in polydimethylsiloxane (pdms) microchannels," *Journal of Microelectromechanical Systems*, vol. 13, pp. 559–567, Aug 2004.

[123] S. L. Maude, T. W. Laetsch, J. Buechner, S. Rives, M. Boyer, H. Bittencourt, P. Bader, M. R. Verneris, H. E. Stefanski, G. D. Myers, M. Qayed, B. De Moerloose, H. Hiramatsu, K. Schlis, K. L. Davis, P. L. Martin, E. R. Nemecek, G. A. Yanik, C. Peters, A. Baruchel, N. Boissel, F. Mechinaud, A. Balduzzi, J. Krueger, C. H. June, B. L. Levine, P. Wood, T. Taran, M. Leung, K. T. Mueller, Y. Zhang, K. Sen, D. Lebwohl, M. A. Pulsipher, and S. A. Grupp, "Tisagenlecleucel in children and young adults with b-cell lymphoblastic leukemia," *New England Journal of Medicine*, vol. 378, no. 5, pp. 439–448, 2018. PMID : 29385370.

[124] M. Wang, J. Munoz, A. Goy, F. L. Locke, C. A. Jacobson, B. T. Hill, J. M. Timmerman, H. Holmes, S. Jaglowski, I. W. Flinn, *et al.*, "Kte-x19 car t-cell therapy in relapsed or refractory mantle-cell lymphoma," *New England Journal of Medicine*, vol. 382, no. 14, pp. 1331–1342, 2020.

[125] L. Li, T. Wan, M. Wan, B. Liu, R. Cheng, and R. Zhang, "The effect of the size of fluorescent dextran on its endocytic pathway," *Cell Biology International*, vol. 39, no. 5, pp. 531–539, 2015. cited By 53.

[126] D. Lapotko, "Optical excitation and detection of vapor bubbles around plasmonic nanoparticles," *Opt. Express*, vol. 17, pp. 2538–2556, Feb 2009.

[127] H. Xiaohua and E.-S. Mostafa A., "Gold nanoparticles : Optical properties and implementations in cancer diagnosis and photothermal therapy," *Journal of Advanced Research*, vol. 1, no. 1, pp. 13 – 28, 2010.

[128] D. Karnakis, "High power single-shot laser ablation of silicon with nanosecond 355 nm," *Applied Surface Science*, vol. 252, no. 22, pp. 7823–7825, 2006. cited By 43.

[129] T. Kovalchuk, G. Toker, V. Bulatov, and I. Schechter, "Laser breakdown in alcohols and water induced by 1064 nm nanosecond pulses," *Chemical Physics Letters*, vol. 500, no. 4-6, pp. 242–250, 2010. cited By 28.

[130] A. Smith and B. Do, "Bulk and surface laser damage of silica by picosecond and nanosecond pulses at 1064 nm," *Applied Optics*, vol. 47, no. 26, pp. 4812–4832, 2008. cited By 150.

[131] R. C. Gonzalez and R. E. Woods, *Digital Image Processing*. Pearson, 2018.

[132] K. Zuiderveld, *Contrast Limited Adaptive Histogram Equalization*, p. 474–485. USA : Academic Press Professional, Inc., 1994.

[133] C. Foglieni, C. Meoni, and A. Davalli, "Fluorescent dyes for cell viability : An application on prefixed conditions," *Histochemistry and Cell Biology*, vol. 115, no. 3, pp. 223–229, 2001. cited By 82.

[134] P. Schendzielorz, K. Froelich, K. Rak, T. Gehrke, A. Scherzad, R. Hagen, and A. Radeloff, "Labeling adipose-derived stem cells with hoechst 33342 : Usability and effects on differentiation potential and dna damage," *Stem Cells International*, vol. 2016, 2016. cited By 3.

[135] G. Szabó, A. Kiss, and S. Damjanovich, "Flow cytometric analysis of the uptake of hoechst 33342 dye by human lymphocytes," *Cytometry*, vol. 2, no. 1, pp. 20–23, 1981. cited By 17.

[136] R. Martin, H. Leonhardt, and M. Cardoso, "Dna labeling in living cells," *Cytometry Part A*, vol. 67, no. 1, pp. 45–52, 2005. cited By 190.

[137] J. Ellwart and P. Dörmer, "Vitality measurement using spectrum shift in hoechst 33342 stained cells," *Cytometry*, vol. 11, no. 2, pp. 239–243, 1990. cited By 54.

[138] T. Santra, S. Kar, T.-C. Chen, C.-W. Chen, J. Borana, M.-C. Lee, and F.-G. Tseng, "Near-infrared nanosecond-pulsed laser-activated highly efficient intracellular delivery mediated by nano-corrugated mushroom-shaped gold-coated polystyrene nanoparticles," *Nanoscale*, vol. 12, no. 22, pp. 12057–12067, 2020. cited By 0.

[139] C. Yao, X. Qu, Z. Zhang, G. Hüttmann, and R. Rahmanzadeh, "Influence of laser parameters on nanoparticle-induced membrane permeabilization," *Journal of Biomedical Optics*, vol. 14, no. 5, 2009. cited By 56.

[140] A. Fales, W. Vogt, K. Wear, T. Pfefer, and I. Ilev, "Experimental investigation of parameters influencing plasmonic nanoparticle-mediated bubble generation with nanosecond laser pulses," *Journal of Biomedical Optics*, vol. 24, no. 6, 2019. cited By 2.

[141] R. Lachaine, C. Boutopoulos, P.-Y. Lajoie, E. Boulais, and M. Meunier, "Rational design of plasmonic nanoparticles for enhanced cavitation and cell perforation," *Nano Letters*, vol. 16, no. 5, pp. 3187–3194, 2016. cited By 18.

[142] S. Wang, L. Fu, Y. Zhang, J. Wang, and Z. Zhang, "Quantitative evaluation and optimization of photothermal bubble generation around overheated nanoparticles excited by pulsed lasers," *Journal of Physical Chemistry C*, vol. 122, no. 42, pp. 24421–24435, 2018. cited By 6.

[143] F. Sauvage, J. Fraire, K. Remaut, J. Sebag, K. Peynshaert, M. Harrington, F. Van De Velde, R. Xiong, M.-J. Tassignon, T. Brans, K. Braeckmans, and S. De Smedt, "Photoablation of human vitreous opacities by light-induced vapor nanobubbles," *ACS Nano*, vol. 13, no. 7, pp. 8401–8416, 2019. cited By 2.

[144] L. Wayteck, R. Xiong, K. Braeckmans, S. De Smedt, and K. Raemdonck, "Comparing photoporation and nucleofection for delivery of small interfering rna to cytotoxic t cells," *J Controlled Release*, vol. 267, pp. 154–162, 2017. cited By 13.

[145] J. Barnes, J. Nauseef, and M. Henry, "Resistance to fluid shear stress is a conserved biophysical property of malignant cells," *PLoS ONE*, vol. 7, no. 12, 2012. cited By 32.

[146] E. VanBavel, "Effects of shear stress on endothelial cells : Possible relevance for ultrasound applications," *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, vol. 93, no. 1-3, pp. 374–383, 2007. cited By 64.

[147] D. Yamane, Y.-C. Wu, T.-H. Wu, H. Toshiyoshi, M. A. Teitell, and P.-Y. Chiou, "Electrical impedance monitoring of photothermal porated mammalian cells," *Journal of Laboratory Automation*, vol. 19, no. 1, pp. 50–59, 2014. PMID : 23797097.

[148] M. Kandušer, M. Šentjurc, and D. Miklavčič, "Cell membrane fluidity related to electroporation and resealing," *European Biophysics Journal*, vol. 35, no. 3, pp. 196–204, 2006. cited By 48.

[149] R. Marchington, Y. Arita, X. Tsampoula, F. Gunn-Moore, and K. Dholakia, "Optical injection of mammalian cells using a microfluidic platform," *Biomedical Optics Express*, vol. 1, no. 2, pp. 527–536, 2010. cited By 25.

[150] A. M. Fales, W. C. Vogt, T. J. Pfefer, and I. K. Ilev, "Author correction : Quantitative evaluation of nanosecond pulsed laser-induced photomodification of plasmonic gold nanoparticles," *Scientific Reports*, vol. 8, 2018.

[151] X. Hu, P. Bessette, J. Qian, C. Meinhart, P. Daugherty, and H. Soh, "Marker-specific sorting of rare cells using dielectrophoresis," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 102, no. 44, pp. 15757–15761, 2005. cited By 341.

[152] N. Pamme, "Magnetism and microfluidics," *Lab on a Chip*, vol. 6, no. 1, pp. 24–38, 2006. cited By 854.

[153] M. Yamada and M. Seki, "Hydrodynamic filtration for on-chip particle concentration and classification utilizing microfluidics," *Lab on a Chip*, vol. 5, no. 11, pp. 1233–1239, 2005. cited By 361.

[154] S. Choi, T. Ku, S. Song, C. Choi, and J.-K. Park, "Hydrophoretic high-throughput selection of platelets in physiological shear-stress range," *Lab on a Chip*, vol. 11, no. 3, pp. 413–418, 2011. cited By 51.

[155] A. Karimi, S. Yazdi, and A. M. Ardekani, "Hydrodynamic mechanisms of cell and particle trapping in microfluidics," *Biomicrofluidics*, vol. 7, no. 2, p. 021501, 2013.

[156] J. Zhou and I. Papautsky, "Fundamentals of inertial focusing in microchannels," *Lab on a Chip*, vol. 13, no. 6, pp. 1121–1132, 2013. cited By 141.

[157] D. Di Carlo, D. Irimia, R. G. Tompkins, and M. Toner, "Continuous inertial focusing, ordering, and separation of particles in microchannels," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 104, no. 48, pp. 18892–18897, 2007.

[158] T. Nakajima, X. Wang, S. Chatterjee, and T. Sakka, "Observation of number-density-dependent growth of plasmonic nanobubbles," *Scientific Reports*, vol. 6, 2016. cited By 9.

[159] A. Vogel, "Optical and acoustic investigations of the dynamics of laser-produced cavitation bubbles near a solid boundary," *Journal of Fluid Mechanics*, vol. 206, pp. 299–338, 1989. cited By 430.

[160] A. Hellman, K. Rau, H. Yoon, and V. Venugopalan, "Biophysical response to pulsed laser microbeam-induced cell lysis and molecular delivery," *Journal of Biophotonics*, vol. 1, no. 1, pp. 24–35, 2008. cited By 55.

[161] F. Magaletti, M. Gallo, L. Marino, and C. M. Casciola, "Dynamics of a vapor nanobubble collapsing near a solid boundary," *Journal of Physics : Conference Series*, vol. 656, p. 012012, dec 2015.

[162] T. G. Papaioannou and C. Stefanadis, "Vascular wall shear stress : basic principles and methods," *Hellenic J Cardiol*, vol. 46, no. 1, pp. 9–15, 2005.

[163] L. Leverett, J. Hellums, C. Alfrey, and E. Lynch, "Red blood cell damage by shear stress," *Biophysical Journal*, vol. 12, no. 3, pp. 257 – 273, 1972.

[164] A. Doukas and T. Flotte, "Physical characteristics and biological effects of laser-induced stress waves," *Ultrasound in Medicine and Biology*, vol. 22, no. 2, pp. 151–164, 1996. cited By 144.

[165] S. Lee, D. McAuliffe, T. Flotte, N. Kollias, and A. Doukas, "Photomechanical transcutaneous delivery of macromolecules," *Journal of Investigative Dermatology*, vol. 111, no. 6, pp. 925–929, 1998. cited By 88.

[166] H. Ju, R. Roy, and T. Murray, "Gold nanoparticle targeted photoacoustic cavitation for potential deep tissue imaging and therapy," *Biomedical Optics Express*, vol. 4, no. 1, pp. 66–76, 2013. cited By 58.

[167] S. Wang, L. Fu, J. Xin, S. Wang, C. Yao, Z. Zhang, and J. Wang, "Photoacoustic response induced by nanoparticle-mediated photothermal bubbles beyond the thermal expansion for potential theranostics," *Journal of Biomedical Optics*, vol. 23, no. 12, 2018. cited By 1.

[168] G. Wang, W. Wang, E. Shangguan, S. Gao, and Y. Liu, "Effects of gold nanoparticle morphologies on interactions with proteins," *Materials Science and Engineering C*, vol. 111, 2020. cited By 0.

[169] A. Woźniak, A. Malankowska, G. Nowaczyk, B. Grześkowiak, K. Tuśnio, R. Słomski, A. Zaleska-Medynska, and S. Jurga, "Size and shape-dependent cytotoxicity profile of gold nanoparticles for biomedical applications," *Journal of Materials Science : Materials in Medicine*, vol. 28, no. 6, 2017. cited By 35.

[170] N. Andrews, P. Almeida, and M. Corrotte, "Damage control : Cellular mechanisms of plasma membrane repair," *Trends in Cell Biology*, vol. 24, no. 12, pp. 734–742, 2014. cited By 69.

[171] S. Kalies, T. Birr, D. Heinemann, M. Schomaker, T. Ripken, A. Heisterkamp, and H. Meyer, "Enhancement of extracellular molecule uptake in plasmonic laser perforation," *Journal of Biophotonics*, vol. 7, no. 7, pp. 474–482, 2014.

[172] A. Takami, H. Kurita, and S. Koda, "Laser-induced size reduction of noble metal particles," *Journal of Physical Chemistry B*, vol. 103, no. 8, pp. 1226–1232, 1999. cited By 460.

[173] A. Welch and M. Van Gemert, *Optical-thermal response of laser-irradiated tissue*. Springer, 2011. cited By 225.

[174] E. Axente, S. Noël, J. Hermann, M. Sentis, and I. Mihailescu, "Correlation between plasma expansion and damage threshold by femtosecond laser ablation of fused silica," *Journal of Physics D : Applied Physics*, vol. 41, no. 10, 2008. cited By 16.

[175] N. Hosoya, I. Kajiwara, T. Inoue, and K. Umenai, "Non-contact acoustic tests based on nanosecond laser ablation : Generation of a pulse sound source with a small amplitude," *Journal of Sound and Vibration*, vol. 333, no. 18, pp. 4254 – 4264, 2014.

[176] Y. Qiang, J. Liu, M. Dao, S. Suresh, and E. Du, "Mechanical fatigue of human red blood cells," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 116, no. 40, pp. 19828–19834, 2019.

[177] C. Ohl, M. Arora, R. Ikink, M. Delius, and B. Wolfrum, "Drug delivery following shock wave induced cavitation," in *CAV03*, 2003.

[178] C.-D. Ohl and B. Wolfrum, "Detachment and sonoporation of adherent hela-cells by shock wave-induced cavitation," *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, vol. 1624, no. 1-3, pp. 131–138, 2003. cited By 94.

[179] G. Segré and A. Silberberg, "Behaviour of macroscopic rigid spheres in poiseuille flow : Part 2. experimental results and interpretation," *Journal of Fluid Mechanics*, vol. 14, no. 1, pp. 136–157, 1962. cited By 490.

[180] F. Rühle, C. Schaaf, and H. Stark, "Optimal control of colloidal trajectories in inertial microfluidics using the saffman effect," *Micromachines*, vol. 11, no. 6, 2020. cited By 0.

[181] D. Lee, S. Nam, J.-A. Kim, D. Di Carlo, and W. Lee, "Active control of inertial focusing positions and particle separations enabled by velocity profile tuning with coflow systems," *Analytical Chemistry*, vol. 90, no. 4, pp. 2902–2911, 2018. cited By 20.

[182] Y. Ukita and Y. Takamura, "Control of secondary flow in concentrically traveling flow on centrifugal microfluidics," *Microfluidics and Nanofluidics*, vol. 15, no. 6, pp. 829–837, 2013. cited By 9.

[183] T. Kawamata, M. Yamada, M. Yasuda, and M. Seki, "Continuous and precise particle separation by electroosmotic flow control in microfluidic devices," *Electrophoresis*, vol. 29, no. 7, pp. 1423–1430, 2008. cited By 33.

[184] X. Ding, S.-C. S. Lin, B. Kiraly, H. Yue, S. Li, I.-K. Chiang, J. Shi, S. J. Benkovic, and T. J. Huang, "On-chip manipulation of single microparticles, cells, and organisms using surface acoustic waves," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 109, no. 28, pp. 11105–11109, 2012.

[185] I. Karampelas, J. Gómez-Pastora, M. Cowan, E. Bringas, I. Ortiz, and E. Furlani, "Numerical analysis of acoustophoretic discrete particle focusing in microchannels," in *Advanced Materials - TechConnect Briefs*, vol. 3, pp. 174–177, 2017. cited By 0.

[186] M. Samandari, K. Abrinia, and A. Sanati-Nezhad, "Acoustic manipulation of bio-particles at high frequencies : An analytical and simulation approach," *Micromachines*, vol. 8, no. 10, 2017. cited By 2.

[187] N. Orloff, J. Dennis, M. Cecchini, E. Schonbrun, E. Rocas, Y. Wang, D. Novotny, R. Simmonds, J. Moreland, I. Takeuchi, and J. Booth, "Manipulating particle trajectories with phase-control in surface acoustic wave microfluidics," *Biomicrofluidics*, vol. 5, no. 4, 2011. cited By 37.

[188] J. Shi, D. Ahmed, X. Mao, S.-C. Lin, A. Lawit, and T. Huang, "Acoustic tweezers : Patterning cells and microparticles using standing surface acoustic waves (ssaw)," *Lab on a Chip*, vol. 9, no. 20, pp. 2890–2895, 2009. cited By 429.

[189] J. Shi, X. Ding, S.-C. Lin, and T. Huang, "Acoustic tweezers : Patterning, focusing, and separating cells and microparticles using standing surface acoustic waves (ssaw)," in *Optics InfoBase*, 2011. cited By 0.

[190] S. Chatterjee and T. Nakajima, "Effects of the shock waves from neighbouring particles on the growth of plasmonic nanobubbles," in *Optics InfoBase*, 2014. cited By 0.

[191] P. Gascoyne and J. Vykoukal, "Particle separation by dielectrophoresis," *Electrophoresis*, vol. 23, no. 13, pp. 1973–1983, 2002. cited By 668.

[192] S. Fiedler, S. G. Shirley, T. Schnelle, and G. Fuhr, "Dielectrophoretic sorting of particles and cells in a microsystem," *Analytical Chemistry*, vol. 70, no. 9, pp. 1909–1915, 1998. PMID : 9599586.

[193] H. Morgan, D. Holmes, and N. Green, "3d focusing of nanoparticles in microfluidic channels," *IEE Proceedings Nanobiotechnology*, vol. 150, no. 2, pp. 76–81, 2003. cited By 60.

[194] M. Zahangir, S. Ibrahim, N. Rani, and N. Malik, "Single particle movement analysis in a continuous flow fluid with magnetophoresis effect," in *IEEE Regional Symposium on Micro and Nanoelectronics*, pp. 149–152, 2019. cited By 0.

[195] C. Wilhelm, F. Gazeau, and J.-C. Bacri, "Magnetophoresis and ferromagnetic resonance of magnetically labeled cells," *European Biophysics Journal*, vol. 31, no. 2, pp. 118–125, 2002. cited By 166.

[196] G. Zabow, F. Assi, R. Jenks, and M. Prentiss, "Guided microfluidics by electromagnetic capillary focusing," *Applied Physics Letters*, vol. 80, no. 8, pp. 1483–1485, 2002. cited By 13.

[197] K. Hoshino, P. Chen, Y.-Y. Huang, and X. Zhang, "Computational analysis of microfluidic immunomagnetic rare cell separation from a particulate blood flow," *Analytical Chemistry*, vol. 84, no. 10, pp. 4292–4299, 2012. cited By 25.

[198] M. Armani, S. Chaudhary, R. Probst, and B. Shapiro, "Using feedback control of microflows to independently steer multiple particles," *Journal of Microelectromechanical Systems*, vol. 15, no. 4, pp. 945–956, 2006. cited By 84.

[199] M. Tanyeri and C. Schroeder, "Manipulation and confinement of single particles using fluid flow," *Nano Letters*, vol. 13, no. 6, pp. 2357–2364, 2013. cited By 72.

[200] D. Kumar, A. Shenoy, S. Li, and C. Schroeder, "Orientation control and nonlinear trajectory tracking of colloidal particles using microfluidics," *Physical Review Fluids*, vol. 4, no. 11, 2019. cited By 2.

[201] M. Nguyen, H. Peerhossaini, E. Pashmi, M. Salek, and M. Jarrahi, "Active control of passive and active particle distribution at the outlet of double y-microchannel using pulsatile flow," *Journal of Fluids Engineering, Transactions of the ASME*, vol. 142, no. 8, 2020. cited By 0.

[202] S. Haeri and J. Shrimpton, "On the application of immersed boundary, fictitious domain and body-conformal mesh methods to many particle multiphase flow," *International Journal of Multiphase Flow*, vol. 40, 2012. cited By 57.

[203] C. S. Peskin, "The immersed boundary method," *Acta Numerica*, vol. 11, p. 479–517, 2002.

[204] C. S. Peskin, "Flow patterns around heart valves : A numerical method," *Journal of Computational Physics*, vol. 10, no. 2, pp. 252 – 271, 1972.

[205] R. Glowinski, T.-W. Pan, T. Hesla, and D. Joseph, "A distributed lagrange multiplier/fictitious domain method for particulate flows," *International Journal of Multiphase Flow*, vol. 25, no. 5, pp. 755 – 794, 1999.

[206] R. Glowinski, T. Pan, T. Hesla, D. Joseph, and J. Périaux, "A fictitious domain approach to the direct numerical simulation of incompressible viscous flow past moving rigid bodies : Application to particulate flow," *Journal of Computational Physics*, vol. 169, no. 2, pp. 363 – 426, 2001.

[207] A. Lefebvre and A. Lefebvre-Lepot, "Fluid-particle simulations with freefem++." working paper or preprint, 2006.

[208] J. Janela, A. Sequeira, and F. Carapau, "Numerical simulation of the motion of rigid particles in generalized newtonian fluids using a hyper-viscosity method," *WSEAS Transactions on Mathematics*, vol. 5, no. 4, pp. 366–373, 2006. cited By 1.

[209] B. Maury, "Direct simulations of 2d fluid-particle flows in biperiodic domains," *Journal of Computational Physics*, vol. 156, no. 2, pp. 325–351, 1999. cited By 64.

[210] H. H. Hu, D. D. Joseph, and M. J. Crochet, "Direct simulation of fluid particle motions," *Theoretical and Computational Fluid Dynamics*, vol. 3, pp. 285–306, Sep 1992.

[211] J. Donea, A. Huerta, J.-P. Ponthot, and A. Rodríguez-Ferran, *Arbitrary Lagrangian–Eulerian Methods*, ch. ALE. John Wiley & Sons, Ltd, 2004.

[212] H. Hu, "Direct simulation of flows of solid-liquid mixtures," *International Journal of Multiphase Flow*, vol. 22, no. 2, pp. 335 – 352, 1996.

[213] J. Sun, K. Wu, D. Su, G. Guo, and Z. Shi, "Continuous separation of magnetic beads using a y-shaped microfluidic system integrated with hard-magnetic elements," *Journal of Physics D : Applied Physics*, vol. 53, no. 3, 2020. cited By 1.

[214] C. Lopez, M. Gutierrez, C. Trujillo, G. Oza, J. Casannova, A. Vera, and L. Leija, "A study by finite elements of the transport of magnetic nanoparticles in a straight microchannel under the influence of a magnetic field generated by a current line," in *16th International Conference on Electrical Engineering, Computing Science and Automatic Control*, 2019. cited By 0.

[215] P. Palovics and M. Rencz, "Numerical modelling of magnetic nanoparticle dynamics in microfluidic devices," in *20th International Conference on Thermal, Mechanical and Multi-Physics Simulation and Experiments in Microelectronics and Microsystems*, 2019. cited By 1.

[216] P. Palovics, M. Nemeth, and M. Rencz, "Cfd modelling of magnetic nanoparticle suspension in microfluidics," in *Symposium on Design, Test, Integration and Packaging of MEMS and MOEMS*, 2019. cited By 0.

[217] F. Hecht, "New development in freefem++," *J. Numer. Math.*, vol. 20, no. 3-4, pp. 251–265, 2012.

[218] G.-B. Lee, C.-I. Hung, B.-J. Ke, G.-R. Huang, B.-H. Hwei, and H.-F. Lai, "Hydrodynamic Focusing for a Micromachined Flow Cytometer ," *Journal of Fluids Engineering*, vol. 123, pp. 672–679, 04 2001.

[219] T. Wagner, A. Kroll, C. R. Haramagatti, H.-G. Lipinski, and M. Wiemann, "Classification and segmentation of nanoparticle diffusion trajectories in cellular micro environments," *PloS one*, vol. 12, no. 1, p. e0170165, 2017.

[220] S. Niyonambaza, E. Boisselier, M. Boukadoum, and A. Miled, "Microfluidic h-filter cell modeling for robust purification of gold nanoparticles," in *IEEE International New Circuits and Systems Conference*, pp. 370–373, 2018. cited By 0.

[221] C. Zhao and X. Cheng, "Microfluidic separation of viruses from blood cells based on intrinsic transport processes," *Biomicrofluidics*, vol. 5, no. 3, 2011. cited By 10.

[222] V. Kachel, H. Fellner-Feldegg, and E. Menke, "Hydrodynamic properties of flow cytometry instruments," *Flow Cytometry and Sorting*, pp. 27–44, 1990. cited By 54.

[223] F. Li, C. Chan, and C. Ohl, "Yield strength of human erythrocyte membranes to impulsive stretching," *Biophysical Journal*, vol. 105, no. 4, pp. 872–879, 2013. cited By 37.

[224] F. Yuan, C. Yang, and P. Zhong, "Cell membrane deformation and bioeffects produced by tandem bubble-induced jetting flow," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 112, no. 51, pp. E7039–E7047, 2015.

[225] J. Khan, B. Pillai, T. Das, Y. Singh, and S. Maiti, "Molecular effects of uptake of gold nanoparticles in hela cells," *ChemBioChem*, vol. 8, no. 11, pp. 1237–1240, 2007. cited By 180.

[226] H.-J. Yen, S.-H. Hsu, and C.-L. Tsai, "Cytotoxicity and immunological response of gold and silver nanoparticles of different sizes," *Small*, vol. 5, no. 13, pp. 1553–1561, 2009. cited By 397.

[227] E.-A. Brujan, K. Nahen, P. Schmidt, and A. Vogel, "Dynamics of laser-induced cavitation bubbles near elastic boundaries : Influence of the elastic modulus," *Journal of Fluid Mechanics*, vol. 433, pp. 283–314, 2001. cited By 157.

[228] A. Vogel, E. Brujan, P. Schmidt, and K. Nahen, "Interaction of laser-produced cavitation bubbles with an elastic tissue model," *Proceedings of SPIE - The International Society for Optical Engineering*, vol. 4257, pp. 167–177, 2001. cited By 12.

[229] S. Egerev, S. Ermilov, O. Ovchinnikov, A. Fokin, D. Guzatov, V. Klimov, A. Kanavin, and A. Oraevsky, "Acoustic signals generated by laser-irradiated metal nanoparticles," *Applied Optics*, vol. 48, no. 7, pp. C38–C45, 2009. cited By 45.

[230] H. Aoyama and T. Okada, "Mechanisms of cell-to-cell and cell-to-substrate adhesion of human epithelial, chang conjunctiva cells," *Cell Structure and Function*, vol. 2, no. 4, pp. 281–288, 1977.

[231] T. Tokiwa, T. Hoshika, M. Shiraishi, and J. Sato, "Mechanism of cell dissociation with trypsin and edta," *Acta Medica Okayama*, vol. 33, no. 1, pp. 1–4, 1979. cited By 6.

[232] U. Triantafillu, J. Nix, and Y. Kim, "Novel fluid shear-based dissociation device for improved single cell dissociation of spheroids and cell aggregates," *Biotechnol Progr*, vol. 34, no. 1, pp. 293–298, 2018. cited By 1.

[233] G. Kretzmer and K. Schügerl, "Response of mammalian cells to shear stress," *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 34, no. 5, pp. 613–616, 1991. cited By 54.

[234] E.-A. Brujan, "Bubble dynamics in a compressible shear-thinning liquid," *Fluid Dynamics Research*, vol. 23, no. 5, pp. 291–318, 1998. cited By 19.

[235] E. Brujan, T. Ikeda, and Y. Matsumoto, "Jet formation and shock wave emission during collapse of ultrasound-induced cavitation bubbles and their role in the therapeutic applications of high-intensity focused ultrasound," *Physics in Medicine and Biology*, vol. 50, no. 20, pp. 4797–4809, 2005. cited By 69.

[236] M. K. Antkowiak, Y. Arita, K. Dholakia, and F. J. Gunn-Moore, "Imaging the cellular response to transient shear stress using stroboscopic digital holography," *Journal of Biomedical Optics*, vol. 16, no. 12, pp. 1 – 4, 2011.

[237] R. Hickling and M. S. Plesset, "Collapse and rebound of a spherical bubble in water," *The Physics of Fluids*, vol. 7, no. 1, pp. 7–14, 1964.

[238] E.-A. Brujan, K. Nahen, P. Schmidt, and A. Vogel, "Dynamics of laser-induced cavitation bubbles near an elastic boundary," *Journal of Fluid Mechanics*, vol. 433, pp. 251–281, 2001. cited By 252.

[239] C.-D. Ohl, M. Arora, R. Ikink, N. de Jong, M. Versluis, M. Delius, and D. Lohse, "Sonoporation from jetting cavitation bubbles," *Biophysical Journal*, vol. 91, no. 11, pp. 4285 – 4295, 2006.

[240] Y. Sato, T. Sato, and D. Yoshino, "Plasma generated in culture medium induces damages of hela cells due to flow phenomena," *Journal of Physics D : Applied Physics*, vol. 51, no. 12, 2018. cited By 2.

[241] J. Soughayer, T. Krasieva, S. Jacobson, J. Ramsey, B. Tromberg, and N. Allbritton, "Characterization of cellular optoporation with distance," *Analytical Chemistry*, vol. 72, no. 6, pp. 1342–1347, 2000. cited By 95.

[242] F. Crawford, *Waves*. McGraw-Hill Book Co., San Francisco, CA, 1968.

[243] Y. Liao, J. Gose, E. Arruda, A. Liu, S. Merajver, and Y. Young, "Shock wave impact on the viability of mda-mb-231 cells," *PLoS ONE*, vol. 15, no. 6, 2020. cited By 0.

[244] T. Kuznetsova, M. Starodubtseva, N. Yegorenkov, S. Chizhik, and R. Zhdanov, "Atomic force microscopy probing of cell elasticity," *Micron*, vol. 38, no. 8, pp. 824–833, 2007. cited By 524.

[245] S. Fong, E. Klaseboer, C. Turangan, B. Khoo, and K. Hung, "Numerical analysis of a gas bubble near bio-materials in an ultrasound field," *Ultrasound in Medicine and Biology*, vol. 32, no. 6, pp. 925–942, 2006. cited By 51.

[246] C. Ohl and R. Ikink, "Shock-wave-induced jetting of micron-size bubbles," *Physical Review Letters*, vol. 90, no. 21, p. 4, 2003. cited By 119.

[247] M. Lokhandwalla, J. McAteer, J. Williams Jr., and B. Sturtevant, "Mechanical haemolysis in shock wave lithotripsy (swl) : Ii. in vitro cell lysis due to shear," *Physics in Medicine and Biology*, vol. 46, no. 4, pp. 1245–1264, 2001. cited By 49.

[248] J. Sundaram, B. R. Mellein, and S. Mitragotri, "An experimental and theoretical analysis of ultrasound-induced permeabilization of cell membranes," *Biophysical Journal*, vol. 84, no. 5, pp. 3087 – 3101, 2003.

[249] L. R. O. F.R.S., "Viii. on the pressure developed in a liquid during the collapse of a spherical cavity," *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science*, vol. 34, no. 200, pp. 94–98, 1917.

[250] M. Hollinshead, A. Vanderplasschen, G. Smith, and D. Vaux, "Vaccinia virus intracellular mature virions contain only one lipid membrane," *Journal of Virology*, vol. 73, no. 2, pp. 1503–1517, 1999. cited By 130.

[251] O. Thoumine and A. Ott, "Time scale dependent viscoelastic and contractile regimes in fibroblasts probed by microplate manipulation," *Journal of Cell Science*, vol. 110, no. 17, pp. 2109–2116, 1997. cited By 330.

[252] S. Egerev, O. Ovchinnikov, and A. Fokin, "Optoacoustic conversion in suspensions : The competition of mechanisms and statistical characteristics," *Acoustical Physics*, vol. 51, no. 2, pp. 160–166, 2005. cited By 6.

[253] M. González, X. Liu, R. Niessner, and C. Haisch, "Strong size-dependent photoacoustic effect on gold nanoparticles by laser-induced nanobubbles," *Applied Physics Letters*, vol. 96, no. 17, 2010. cited By 44.

[254] J. Noack and A. Vogel, "Laser-induced plasma formation in water at nanosecond to femtosecond time scales : calculation of thresholds, absorption coefficients, and energy density," *IEEE Journal of Quantum Electronics*, vol. 35, pp. 1156–1167, Aug 1999.

[255] A. Vogel, K. Nahen, D. Theisen, and J. Noack, "Plasma formation in water by picosecond and nanosecond nd :yag laser pulses. i. optical breakdown at threshold and superthreshold irradiance," *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics*, vol. 2, pp. 847–860, Dec 1996.

[256] A. Kadhim, E. Salim, S. Fayadh, A. Al-Amiery, A. Kadhum, and A. Mohamad, "Effect of multipath laser shock processing on microhardness, surface roughness, and wear resistance of 2024-t3 al alloy," *The Scientific World Journal*, vol. 2014, 2014. cited By 26.

[257] Z. Fang, Y.-R. Zhen, O. Neumann, A. Polman, F. J. García de Abajo, P. Nordlander, and N. J. Halas, "Evolution of light-induced vapor generation at a liquid-immersed metallic nanoparticle," *Nano Letters*, vol. 13, no. 4, pp. 1736–1742, 2013. PMID : 23517407.

[258] S. Cross, Y.-S. Jin, J. Rao, and J. Gimzewski, "Nanomechanical analysis of cells from cancer patients," *Nature Nanotechnology*, vol. 2, no. 12, pp. 780–783, 2007. cited By 960.

[259] S. Cross, Y.-S. Jin, J. Tondre, R. Wong, J. Rao, and J. Gimzewski, "Afm-based analysis of human metastatic cancer cells," *Nanotechnology*, vol. 19, no. 38, 2008. cited By 205.

[260] K. Kim, C. Cho, E. Park, M.-H. Jung, K.-S. Yoon, and H.-K. Park, "Afm-detected apoptotic changes in morphology and biophysical property caused by paclitaxel in ishikawa and hela cells," *PLoS ONE*, vol. 7, no. 1, 2012. cited By 68.

[261] K. Haase and A. Pelling, "Investigating cell mechanics with atomic force microscopy," *Journal of the Royal Society Interface*, vol. 12, no. 104, 2015. cited By 72.

[262] A. Doukas, D. McAuliffe, and T. Flotte, "Biological effects of laser-induced shock waves : Structural and functional cell damage in vitro," *Ultrasound in Medicine and Biology*, vol. 19, no. 2, pp. 137–146, 1993. cited By 92.

[263] A. Yakunin, Y. Avetisyan, and V. Tuchin, "Scaling of photothermal effects accounting for localization of cw and pulse laser radiation within plasmonic nanoparticles," in *Proceedings of SPIE*, vol. 8580, 2013. cited By 2.

[264] S. Byun, S. Son, D. Amodei, N. Cermak, J. Shaw, J. Kang, V. Hecht, M. Winslow, T. Jacks, P. Mallick, and S. Manalis, "Characterizing deformability and surface friction of cancer cells," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 110, no. 19, pp. 7580–7585, 2013. cited By 129.

[265] J.-F. Berret, "Local viscoelasticity of living cells measured by rotational magnetic spectroscopy," *Nature Communications*, vol. 7, 2016. cited By 22.

[266] M. Yokokawa, K. Takeyasu, and S. Yoshimura, "Mechanical properties of plasma membrane and nuclear envelope measured by scanning probe microscope," *Journal of Microscopy*, vol. 232, no. 1, pp. 82–90, 2008. cited By 25.

[267] P. McNeil and R. Steinhardt, "Plasma membrane disruption : Repair, prevention, adaptation," *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, vol. 19, pp. 697–731, 2003. cited By 283.

[268] V. Idone, C. Tam, J. Goss, D. Toomre, M. Pypaert, and N. Andrews, "Repair of injured plasma membrane by rapid ca2+ dependent endocytosis," *Journal of Cell Biology*, vol. 180, no. 5, pp. 905–914, 2008. cited By 210.

[269] E. Caler, S. Chakrabarti, K. Fowler, S. Rao, and N. Andrews, "The exocytosis-regulatory protein synaptotagmin vii mediates cell invasion by trypanosoma cruzi," *Journal of Experimental Medicine*, vol. 193, no. 9, pp. 1097–1104, 2001. cited By 59.

[270] A. Draeger, K. Monastyrskaya, and E. Babiychuk, "Plasma membrane repair and cellular damage control : The annexin survival kit," *Biochemical Pharmacology*, vol. 81, no. 6, pp. 703–712, 2011. cited By 92.

[271] A. McNeil, U. Rescher, V. Gerke, and P. McNeil, "Requirement for annexin a1 in plasma membrane repair," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 281, no. 46, pp. 35202–35207, 2006. cited By 132.

[272] E. Shannon, A. Stevens, W. Edrington, Y. Zhao, A. Jayasinghe, A. Page-McCaw, and M. Hutson, "Multiple mechanisms drive calcium signal dynamics around laser-induced epithelial wounds," *Biophysical Journal*, vol. 113, no. 7, pp. 1623–1635, 2017. cited By 0.

[273] S. Ollivier, E. Salze, P. V. Yuldashev, and M. V. Averiyanov, "Mesure d'ondes de choc acoustique : influence de la réponse des microphones," in *10ème Congrès Français d'Acoustique* (S. F. d'Acoustique SFA, ed.), (Lyon, France), pp. –, Apr. 2010.

[274] B. Treeby, J. Jaros, A. Rendell, and B. Cox, "Modeling nonlinear ultrasound propagation in heterogeneous media with power law absorption using a k-space pseudospectral method," *Journal of the Acoustical Society of America*, vol. 131, no. 6, pp. 4324–4336, 2012. cited By 123.

[275] J. Hildebrand and D. Rugar, "Measurement of cellular elastic properties by acoustic microscopy," *Journal of microscopy*, vol. 134, no. 3, pp. 245–260, 1984.

[276] N. Bertin, R. Wunenburger, E. Brasselet, and J.-P. Delville, "Liquid-column sustainment driven by acoustic wave guiding," *Physical Review Letters*, vol. 105, no. 16, 2010. cited By 8.

[277] J. Padilla-Martinez, J. Ramirez-San-Juan, C. Berrospe-Rodriguez, N. Korneev, G. Aguilar, P. Zaca-Moran, and R. Ramos-Garcia, "Controllable direction of liquid jets generated by thermocavitation within a droplet," *Applied Optics*, vol. 56, no. 25, pp. 7167–7173, 2017. cited By 0.

[278] C. De Pablo, J. Avila, T. Cabada, F. Guerrero, and J. Olmedo, "Photoacoustic effect measurement in aqueous suspensions of gold nanorods caused by low-frequency and low-power near-infrared pulsing laser irradiation," *Applied Optics*, vol. 52, no. 19, pp. 4698–4705, 2013. cited By 2.

[279] J. A. Giordmaine and R. C. Miller, "Tunable coherent parametric oscillation in linbo_3 at optical frequencies," *Phys. Rev. Lett.*, vol. 14, pp. 973–976, Jun 1965.

[280] Y. X. Fan, R. C. Eckardt, R. L. Byer, C. Chen, and A. D. Jiang, "Barium borate optical parametric oscillator," *IEEE Journal of Quantum Electronics*, vol. 25, pp. 1196–1199, Jun 1989.

[281] A. C. Lapadatu and H. Jakobsen, "Chapter thirty two - anodic bonding," in *Handbook of Silicon Based MEMS Materials and Technologies* (V. Lindroos, M. Tilli, A. Lehto, and T. Motooka, eds.), Micro and Nano Technologies, pp. 513 – 520, Boston : William Andrew Publishing, 2010.

[282] U. Grässer, M. Bubel, D. Sossong, M. Oberringer, T. Pohlemann, and W. Metzger, "Dissociation of mono- and co-culture spheroids into single cells for subsequent flow cytometric analysis," *Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger*, vol. 216, pp. 1 – 8, 2018.

[283] K. A. Knudsen, L. Myers, and S. A. McElwee, "A role for the ca2+-dependent adhesion molecule, n-cadherin, in myoblast interaction during myogenesis," *Experimental Cell Research*, vol. 188, no. 2, pp. 175 – 184, 1990.

[284] A. Reichard and K. Asosingh, "Best practices for preparing a single cell suspension from solid tissues for flow cytometry," *Cytometry Part A*, vol. 95, no. 2, pp. 219–226, 2019.

TABLE DES FIGURES

2.1 Principaux mécanismes de la photoporation avec AuNP . . . 17
2.2 Différence entre incorporation passive et diffusion *via* des nanopores . . . 18
2.3 Paramètres clefs de la photoporation . . . 19
2.4 Préparation et traitement d'échantillon par photoporation . . . 21
2.5 Profil spatial du laser de photoporation . . . 24
2.6 Montage optique pour la photoporation . . . 25
2.7 Interfaçage et automatisation du traitement par photoporation . . . 27
2.8 Imagerie cellulaire de photoporation et de suivi de croissance cellulaire . . . 29
2.9 Synthèse du protocole de photoporation . . . 30
2.10 Évaluation de la viabilité des cellules photoporées . . . 32
2.11 Quantification de la fraction positive . . . 34
2.12 Photoporation à l'échelle de la cellule unique . . . 35
2.13 Cartographie des fractions positives locales . . . 38
2.14 Perméabilisation par photoporation en fonction de la concentration de nanoparticules . . . 40
2.15 Différence de marquage Hoechst selon l'état cellulaire . . . 41
2.16 Fluorescence FITC intracellulaire et écart-type . . . 41
2.17 Fluorescence FITC intracellulaire et mode . . . 42
2.18 Fluorescence FITC et Hoechst intracellulaire . . . 43
2.19 Corrélation du profil d'intensité du laser et des fractions positives spatiales . . . 44
2.20 Évolution en fonction du profil d'intensité du laser des fractions positives . . . 46
2.21 Variabilité de la concentration ambiante sur la photoporation . . . 49

3.1 Approches de la photoporation avec séparation . . . 53
3.2 Protocole de photoporation en flux . . . 58
3.3 Processus de Microfabrication de puce microfluidique . . . 59
3.4 Montage optique pour la photoporation en flux . . . 61
3.5 Analyse de l'efficacité et de la viabilité en flux . . . 63
3.6 Perméabilisation par photoporation en flux . . . 66
3.7 Description de la fluorescence intracellulaire . . . 68
3.8 Perméabilisation par photoporation en flux et cisaillement . . . 71
3.9 Passage en flux et fluorescence intracellulaire . . . 73

3.10 Perméabilisation par photoporation en flux avec deux concentrations d'AuNP 76
3.11 Fluorescence intracellulaire d'échantillons traités en flux 78
3.12 Perméabilisation par photoporation en flux avec différentes irradiations 82
3.13 Fluorescence intracellulaire des échantillons traités avec différentes irradiations 83

4.1 Modélisation et validation du contrôle de nanoparticules en écoulement microfluidique 93
4.2 Géométries de focalisation hydrodynamique 95
4.3 Modélisation d'un écoulement bi-phasique par la méthode des éléments finis 98
4.4 Influence des paramètres de géométries et de flux 103
4.5 Contrôle de la position par rapport au centre du canal 104
4.6 Focalisation hydrodynamique : notations 105
4.7 Approximation des résultats numériques pour la largeur w^*_{NP} 107
4.8 Largeur des flux porteurs 108
4.9 Représentation numérique d'une section du canal de sortie 110
4.10 Représentation d'une section du canal de sortie pour la focalisation 3D pour $w_s = 50$ µm 111
4.11 Représentation d'une section du canal de sortie pour $w_s = 800$ µm 113
4.12 Contrôle de la distance cellule-nanoparticules avec un séparateur 115
4.13 Taux de cisaillement et contraintes fluidiques 116

5.1 Caractérisation de l'écoulement cellulaire : agrégats 126
5.2 Protocole de photoporation en flux à distance 128
5.3 Perméabilisation de cellules par photoporation à distance nulle 132
5.4 Perméabilisation de cellules par photoporation en flux à distance 134
5.5 Efficacité d'incorporation de la photoporation en flux à distance 139
5.6 Contraintes mécaniques générées pendant la photoporation 142
5.7 Caractérisation de l'efficacité d'incorporation pour la photoporation en flux 147
5.8 Efficacité d'incorporation et degré de perméabilisation 148

6.1 Guide d'onde fluidique pour la photoporation en flux 163

A.1 Notation pour l'étude des faisceaux gaussiens 168
A.2 Caractéristiques de la source laser pour la photoporation 177

B.1 Prise d'image par Microscopie en fluorescence des échantillons 180

C.1 Préparation des échantillons après le traitement opto-fluidique 184

D.1 Microfabrication d'une puce Verre-Si-Verre 200
D.2 Collage anodique verre silicium 201

E.1 Interfaçage du dispositif opto-fluidique à l'aide du logiciel LabVIEW 203
E.2 Principe du contrôle en débit 206

F.1 Dissociation des agrégats cellulaires pendant le traitement opto-fludique 208