



HAL
open science

Développement d'un réseau microvasculaire sur puce microfluidique pour la reconstruction tissulaire

Thibault Krammer

► **To cite this version:**

Thibault Krammer. Développement d'un réseau microvasculaire sur puce microfluidique pour la reconstruction tissulaire. Biotechnologies. Université Grenoble Alpes, 2019. Français. NNT : 2019GREAV044 . tel-02612628

HAL Id: tel-02612628

<https://theses.hal.science/tel-02612628>

Submitted on 19 May 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE LA COMMUNAUTE UNIVERSITE GRENOBLE ALPES

Spécialité : **Biotechnologie**

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

Thibault KRAMMER

Thèse dirigée par **Marie CARRIERE**, ingénieure de recherche,
CEA et co-dirigée par **Jean-Jacques FEIGE**, directeur de
recherche, **INSERM-CEA-UJF**

préparée au sein du **Laboratoire des Systèmes
Microfluidiques et de Bioingénierie – CEA-Leti/DTBS**
dans l'**École Doctorale Chimie et Sciences du Vivant**

Développement d'un réseau microvasculaire sur puce microfluidique pour la reconstruction tissulaire

Thèse soutenue publiquement le **10 décembre 2019**, devant le
jury composé de :

Mme, Cécile, LEGALLAIS

Directrice de recherche, UTC Compiègne, Rapportrice

M, Nicolas, BAEYENS

Professeur, ULB Bruxelles, Rapporteur

Mme, Catherine, PICART

Directrice de recherche, LMGP Grenoble, Présidente du Jury

Mme, Séverine, LE GAC

Professeure associée, UT Twente, Examinatrice

M, Frédéric, BOTTAUSCI

Ingénieur de recherche, CEA, Invité

Mme, Florence, RIVERA

Ingénieure de recherche, CEA, Invité



Remerciements

Je tiens à remercier de nombreuses personnes qui ont rendu cette thèse agréable.

Je remercie particulièrement mes encadrants de thèse, Flo et Fred. J'ai eu énormément de chances d'être tombé sur des encadrants comme vous. Fred, tu as toujours été d'un soutien infailible. Ta capacité à être toujours de bonne humeur, à relativiser et à encourager ont été une aide considérable pour supporter les moments de doutes où les résultats étaient difficiles à obtenir. C'était un bonheur de travailler au quotidien avec toi, on a su instaurer une relation de confiance qui m'ont permis de m'épanouir pleinement durant cette thèse. Flo, tu m'as apporté ta passion pour ton métier, ton dévouement que je considère si important dans ce domaine et je suis très heureux d'avoir pu partager tes valeurs. Je m'identifie beaucoup à toi dans ce métier et tu représentes le type de chercheur que je souhaite devenir. Tes analyses, ton esprit critique, ta rigueur sont autant de qualités que je partage et essaie d'intégrer dans mon travail. Hors professionnel, je respecte énormément les valeurs que tu prônes et je suis heureux de la relation de confiance que l'on a tissée.

Je remercie également ma directrice de thèse, Marie, ainsi que mes co-encadrants, Jean-Jacques et Sabine. Vous avez été d'une grande aide durant ma thèse, autant scientifiquement que moralement. Vous ne vous en êtes probablement pas rendus compte, mais vous avez été une véritable bouffée d'oxygène durant une période où j'en avais besoin. Vous êtes des personnes dévouées et faites de la recherche pour des raisons que je partage. Le fait de vous avoir eu à mes côtés et d'avoir eu à faire à votre passion, votre optimisme et votre enthousiasme m'a apporté une forte motivation pour persévérer sur le projet.

J'en profite pour fortement remercier Agnès ! Tu m'as donné énormément de ton temps afin de m'aider à obtenir ces tranches de tissus, sans contre-parties, par simple entraide. Le fait que tu m'aies fourni ton aide de manière spontanée et désintéressée signifie beaucoup pour moi. De la même manière, je remercie Amandine pour m'avoir aidé à effectuer des découpes ponctuellement ! Vous m'avez permis d'obtenir les résultats que j'ai présentés dans cette thèse.

Un remerciement global est adressé à la team BIOCAPAN : Maxime, David, Anne-Carey (James), Claire (même si t'es partie avec que j'arrive), Roxane, Guillaume et Aurélie. On a formé une très belle équipe et c'était génial de bosser avec vous, que ce soit en réunion avec des croissants, en salle de manip' avec des karaokés ou bien le midi pour des débats enflammés (particulièrement grâce à toi Maxime).

Je continue les remerciements “professionnels” en adressant une pensée à Manu, François et Nico. Merci pour les nombreuses cartes microfluidiques que vous m’avez usinées durant cette thèse. Vous avez toujours fait ça dans la bonne humeur et avec qualité! C’était un régal de vous cotoyer, et merci pour la carte personnalisée : FORZA JUVENTUS!!!!

Je remercie également les partenaires de labo bio : Camille, Adrien, Estelle, Camille et Clément (Maxime et Roxane encore). Pour la plupart vous êtes arrivés sur le tard pour ne pas avoir eu à supporter nos chants trop longtemps, mais j’aurai aimé vous cotoyer plus longtemps et partager plus de discussions avec vous!

Je remercie également Pierre Blandin pour ta disponibilité et ton aide, notamment sur le traitement des images de μ PIV. On voit de suite que tu es une personne géniale, ouverte, disponible et c’est un plaisir de bosser avec des personnes comme toi.

Merci aussi à Stéphanie pour m’avoir aidé à effectuer des images au microscope confocal et pour avoir galéré à reconstruire toutes mes images.

D’un point de vue global, je remercie l’ensemble des personnes du laboratoire LBCP, puis LBAM, puis LSMB. Merci pour ces pauses croissants ou apéro du vendredi soir. C’était un plaisir de passer ces moments avec vous! Un merci particulier à Frédéric Revol-Cavalier pour m’avoir recruté pour ce stage qui m’a ouvert les portes de ma thèse!

J’adresse une pensée à tous les partenaires de courses : Thomas, Charlotte, Charlotte, Mélissa, Maud, ... et j’en passe! Gardez votre bonne humeur et continuez de prendre de belles photos de la Bastille enneigée et ensoleillée!

Merci aussi aux thésards et stagiaires du d’enfer : Thomas Courant, Emilie, Maxime, Maxime, David, Charlotte, Céline, Hadrien, Thomas (& Marianne!!), Giac, Vivian, Eloïse, Rox et tutti cuenti! On a passé de nombreux très bons moments, sobres ... ou pas. On se rappellera à jamais de ce bar et de ces jeudi soirs à la pelle!

Vivian, Giac, Thomas, je vous réserve une place particulière au premier niveau du jacuzzi. Vivian, même si t’es chévrophile, t’es unique! Giacomo, t’es ma référence et t’as été un encadrant de stage exceptionnel! Et Thomas, mon co-bureau, même si je détestais tes tapes sur l’épaule inattendues, t’es un ami génial avec de superbes valeurs!

Et merci au groupe Miam’ : Clément, Mathilde, Juliette, Prisca, Emilie. Les repas en votre présence (qui était dure à avoir quand même) étaient les éclaircis de mes journées de rédaction ou manips’. Les histoires interminables d’Emilie, les anecdotes de colloc’ de Mathilde, les analyses cinématographiques de Clément ... c’était génial et je suis triste de ne plus y assister. J’espère que tout va se passer pour le mieux pour la suite de votre thèse et que vous allez garder votre joie caractéristique!

Je termine ces remerciements par une note plus personnelle, les remerciements que je n’arrive pas à faire mais qui signifient le plus.

Aurélie, t’as été plus qu’une stagiaire géniale! Les 6 mois où tu as été là ont été simplement géniaux pendant les horaires de travail (si on peut appeler ça du travail : 19/20 maggle) mais aussi en dehors. Comme on t’a trop bien choisi avec Fred et Roxane!

Sophie, la révélation trop courte de la thèse. Même si tu nous as snobé au début, c'était dur de se passer de toi par la suite. T'as laissé un gros vide en partant. Toute baltringue que tu es, je n'ai pas eu besoin de plusieurs heures pour me rendre compte que je te ferai toujours confiance. Et merci d'avoir apporté en plus ton mari dans l'équation, on a hâte de passer de futurs moments avec vous !

Pour cette partie je la fais très courte car vous étiez plus loin de ma thèse, mais merci à tout l'ensemble de la fake-liste. Tous les moments passés avec vous pendant sont très précieux et me permettent de déconnecter totalement.

Roxane, étonnamment tu mériterais le plus long des paragraphes et le plus de détails mais tu ne récolteras que quelques lignes. Je ne pourrai même pas imaginer la thèse si tu n'avais pas été là. J'aurai tellement de remerciements à te faire, mais je ne sais pas comment les formuler. Tu es la plus précieuse des amies. Merci.

Ma famille, maman, papa. On ne sait pas se dire ces choses-là mais j'ai conscience de l'énorme chance que j'ai d'être dans cette famille. Je vous aime.

Julie, doudou, merci. Je vais faire très court également, surtout que tu es juste à côté de moi en train de me regarder en ce moment, et que tu auras d'autres occasions pour lesquelles je te dirai mes émotions. Tu as été d'un soutien infailible durant toute cette thèse et tu me fais oublier tous les problèmes du quotidien ! Ma vie est parfaite parce que je la partage avec toi.

Table des matières

Remerciements	i
Table des matières	v
Introduction	ix
1 Etat de l'art	1
1.1 L'environnement tissulaire	1
1.1.1 Les tissus conjonctifs	1
1.1.2 Les biopolymères <i>in vitro</i>	3
1.2 Le réseau vasculaire	5
1.2.1 Caractéristiques du réseau microvasculaire	5
1.2.2 La complexité de l'endothélium	9
1.3 Les techniques de vascularisation <i>in vitro</i>	10
1.3.1 L'auto-assemblage	10
1.3.2 L'endothélisation de surfaces	16
1.3.2.1 Développement d'un endothélium sur un substrat plan	16
1.3.2.2 Développement d'un endothélium sur la surface interne de canaux creux	21
1.3.3 Fabrication additive	28
1.3.3.1 La bioimpression	28
1.3.3.2 Assemblage modulaire	37
1.3.4 Bilan récapitulatif	40
1.4 Les reproductions d'organes & tissus	42
1.4.1 Les modèles d'organes & tissus	42
1.4.2 Bilan récapitulatif	48
2 Présentation de la stratégie de vascularisation	55
2.1 Les caractéristiques du réseau microvasculaire	56
2.2 La technique de vascularisation utilisée	57
2.3 Avantages de la technique d'assemblage modulaire	60
3 Matériels & Méthodes	65

3.1	Génération des microbilles	65
3.1.1	Système microfluidique	65
3.1.1.1	Géométrie microfluidique pour la production de microbilles	65
3.1.1.2	Fabrication des cartes microfluidiques	66
3.1.1.3	Solutions utilisées	69
3.1.1.4	Banc expérimental	72
3.1.1.5	Protocole	74
3.1.2	Centricaps	74
3.1.2.1	Fabrication du dispositif	75
3.1.2.2	Protocole	75
3.2	Construction de l'empilement et perfusion	76
3.2.1	Recouvrement des microbilles de cellules endothéliales	76
3.2.1.1	Culture cellulaire	76
3.2.1.2	Protocole d'accroche	76
3.2.2	Empilement des microbilles	77
3.2.2.1	Construction de la carte microfluidique	77
3.2.2.2	Injection des microsphères	78
3.2.3	Caractérisation du flux	79
3.2.3.1	Principe de la μ PIV	79
3.2.3.2	Acquisition des images	80
3.2.3.3	Traitement des images	83
3.2.4	Perfusion de l'empilement	85
3.3	Caractérisation du réseau vasculaire	87
4	Conception des microsphères	89
4.1	Techniques d'encapsulation et biopolymère	89
4.1.1	Les techniques d'encapsulation	89
4.1.1.1	Les technologies de dripping	90
4.1.1.2	Les technologies microfluidiques	91
4.1.1.3	Gélification des gouttes	95
4.1.2	Le biomatériau utilisé : le collagène	96
4.1.2.1	Structure du collagène	96
4.1.2.2	Fibrillogénèse du collagène	97
4.1.2.3	La production de microsphères de collagène dans la littérature	99
4.2	Production de microsphères de collagène par la technique microfluidique . .	102
4.2.1	Système de production	103
4.2.1.1	Production des microgouttes	103
4.2.1.2	Gélification des microgouttes de collagène	105
4.2.2	Coalescence des microsphères de collagène	107
4.2.3	Utilisation de l'alginate pour la production de microsphères contenant du collagène	115

4.2.3.1	Composition de l'alginate	115
4.2.3.2	Gélification de l'alginate	115
4.2.3.3	Production de microsphères de collagène et alginate	117
4.3	Production de microsphères de collagène par la technique Centricaps	124
4.3.1	Principe du dispositif	124
4.3.2	Production de microsphères d'alginate - collagène	125
4.3.2.1	Production des microsphères	125
4.3.2.2	Gélification des microsphères	128
5	Ecoulement au sein d'un empilement de microsphères	131
5.1	La structure poreuse des empilements de sphères	131
5.1.1	Porosité	132
5.1.1.1	Empilements ordonnés	132
5.1.1.2	Empilements aléatoires	133
5.1.2	Dimension locale des pores	134
5.1.2.1	Cas de l'empilement hexagonal compact	134
5.1.2.2	Cas de l'empilement aléatoire	135
5.1.2.3	Effet de parois	138
5.2	Etude de l'écoulement au sein de l'empilement de sphères	140
5.2.1	Etablissement du cisaillement moyen	140
5.2.1.1	Définitions des paramètres	141
5.2.1.2	Les paramètres caractéristiques de l'empilement de sphères	142
5.2.1.3	Caractérisation de l'écoulement	146
5.2.1.4	Le cisaillement global	149
5.2.2	Les variations locales de vitesse	150
5.3	Caractérisation expérimentale de l'écoulement : μ PIV	157
5.3.1	Réalisation de l'empilement	157
5.3.1.1	Dispositif de rétention des microsphères	157
5.3.1.2	Formation de l'empilement	160
5.3.2	Mesure du cisaillement : μ PIV	167
5.3.2.1	Acquisition & traitement des images	167
5.3.2.2	Champ de vitesses	169
5.4	Conclusion	175
6	Formation et caractérisation du réseau vascularisé	177
6.1	Recouvrement des microsphères de cellules endothéliales	177
6.1.1	Affinité des cellules endothéliales avec le biopolymère	177
6.1.1.1	Etude de la littérature	177
6.1.1.2	Culture des cellules endothéliales sur gel plan	178
6.1.2	Recouvrement des capsules	179
6.1.2.1	Proportion du mélange d'alginate et collagène	179

6.1.2.2	Paramètres influençant le recouvrement des cellules endothéliales	181
6.1.2.3	Ajustement du protocole d'accroche	183
6.2	Conception de l'empilement de sphères endothélialisées et perfusion	190
6.2.1	Formation de l'empilement	190
6.2.2	Culture et perfusion des cellules endothéliales	192
6.2.2.1	Système de perfusion type bioréacteur	193
6.2.2.2	Croissance des cellules endothéliales au sein de l'empilement	193
6.2.2.3	Perfusion de particules fluorescentes	197
6.3	Caractérisation du réseau de capillaires	201
6.3.1	Analyse de sections transverses à la direction de l'écoulement	202
6.3.2	Perfusion de lectine	204
7	Conclusion	215
	Références	221

Introduction

Introduction à l'ingénierie tissulaire

La médecine occidentale emploie, à l'heure actuelle, différentes stratégies afin de soigner un patient : lui administrer des molécules thérapeutiques, greffer de nouveaux tissus ou organes, ou bien suppléer à ces organes défaillants par le biais d'instruments médicaux. Cette dernière stratégie est généralement peu agréable, contraignante pour le patient et, bien souvent, moins fiable que la biologie. L'administration de molécules thérapeutiques cible un tissu ou un organe particulier, mais les interactions inter-organes causent fréquemment l'apparition d'effets secondaires indésirables pour le patient. De plus, le développement de nouveaux traitements thérapeutiques est un processus long et extrêmement coûteux aux entreprises. La greffe d'organes est parfois l'unique traitement permettant le rétablissement des fonctions d'un organe. Ce traitement est néanmoins victime de son succès : en 2018, en France, 5805 greffes d'organes ont été réalisées (dont 541 à partir de donneurs vivants) alors que 24.791 patients sont toujours en attente de transplantation. De plus, les différences génétiques entre les donneurs et receveurs entraînent la prise de traitements immunosuppresseurs lourds ainsi que des complications pouvant annuler la greffe.

L'ingénierie tissulaire est une discipline visant à améliorer l'ensemble des techniques de soin des patients. Le but de l'ingénierie tissulaire est de reconstruire, à partir de cellules humaines, des tissus fonctionnels et des organes dans le but de suppléer, soutenir ou améliorer des tissus humains malades ou endommagés [1]. Ce domaine s'appuie sur le principe du biomimétisme, en combinant les sciences du vivant et les sciences de l'ingénieur. Elle se rapproche de la médecine réparatrice ou régénérative dont l'application est l'implantation chez le patient [2, 3]. Cependant, les constructions tissulaires développées jusqu' alors se confrontent à des problèmes législatifs, de financement et de complexité de développement empêchant leur utilisation thérapeutique. Un des objectifs ultime de l'ingénierie tissulaire est la conception de tissus et organes *in vitro* pouvant être implantés en remplacement d'un organe défaillant.

Le développement de nouveaux traitements thérapeutiques

Les conceptions *in vitro* de modèles reproductifs des tissus et organes humains *in vivo* promettent également d'améliorer le développement de molécules thérapeutiques.

De nos jours, le développement d'un nouveau médicament jusqu'à sa mise sur le mar-

ché est un processus long et extrêmement coûteux pour les entreprises. Afin qu'une nouvelle molécule thérapeutique soit commercialisée, elle doit valider 4 étapes successives : la recherche exploratoire, la phase de développement (ou essais pré-cliniques), les essais cliniques et la mise sur le marché. Durant la phase de recherche exploratoire, le laboratoire de recherche sélectionne des milliers de candidats moléculaires susceptibles de soigner une maladie ou d'en atténuer les effets, sans connaître leurs réels impacts sur le corps humain. Une fois ces molécules identifiées, elles sont ensuite testées sur des cellules puis sur des animaux lors de la phase de développement. Dans le cas où ces tests prouvent leur efficacité, une molécule que l'on appelle candidat médicament est choisie afin d'évaluer ses effets sur l'homme lors des essais cliniques.

Il est estimé que l'ensemble de ces étapes nécessite en moyenne une douzaine d'années et approximativement 2.5 milliards de dollars aux entreprises afin de sortir un de leurs candidats sur le marché [4]. Toutes les autres molécules échouent durant une des étapes de validation du processus de développement, et plus elles échouent tard, plus le coût investi aura été important. De plus, les coûts de développement d'un médicament tendent à augmenter au fil des années quand le nombre de médicaments approuvés ne cesse de décroître. Cette tendance suit la loi d'Eroom. Cette loi tient son nom de Gordon Moore, co-fondateur de la société fabricante de semi-conducteurs Intel. Moore avait prédit, dès 1965, que le nombre de transistors contenus dans les processeurs CPU allaient doubler tous les deux ans (en réalité 1.8 ans) sans coûts supplémentaires, conséquence du développement constant des nouvelles technologies. De ce fait, la puissance des processeurs est augmentée toutes les deux années de manière exponentielle, quand le coût de production est réduit. Ce modèle s'est avéré très proche de la réalité dans de nombreux domaines. Dans le domaine pharmaceutique, alors qu'on pourrait penser que les progrès scientifiques et technologiques augmenteraient l'efficacité de la recherche et du développement (R&D) de nouveaux médicaments, cette loi n'est pas vérifiée. C'est en réalité la tendance inverse qui est observée, d'où la loi d'Eroom (Moore épelée à l'envers). Cette loi décrit que le nombre de nouveaux médicaments approuvés par milliard de dollars US dépensés dans la R&D diminue de moitié tous les 9 ans depuis 1950 (Figure 1).

Cette tendance montre que le coût de R&D inhérent à l'apparition d'un nouveau médicament sur le marché devient de plus en plus important au fil des ans. Des explications de ce phénomène sont présentées dans la publication de J.W. Scanell et al. [5]. Ainsi, les entreprises pharmaceutiques cherchent à réduire ces coûts en améliorant l'efficacité de la recherche.

L'échec des dispositifs prédictifs et la recherche de plateformes de tests plus performantes

Une des étapes cruciales de la conception d'un médicament est le passage des essais précliniques aux essais cliniques. Il a été évalué que plus de 9 molécules sur 10 validant la phase de développement échouent lors des premiers essais sur les patients. Ceci s'explique par le fait que les tests pratiqués lors des études pré-cliniques sont classiquement réalisés sur des cultures cellulaires en boîte de Pétri et sur des modèles animaux. Le principal

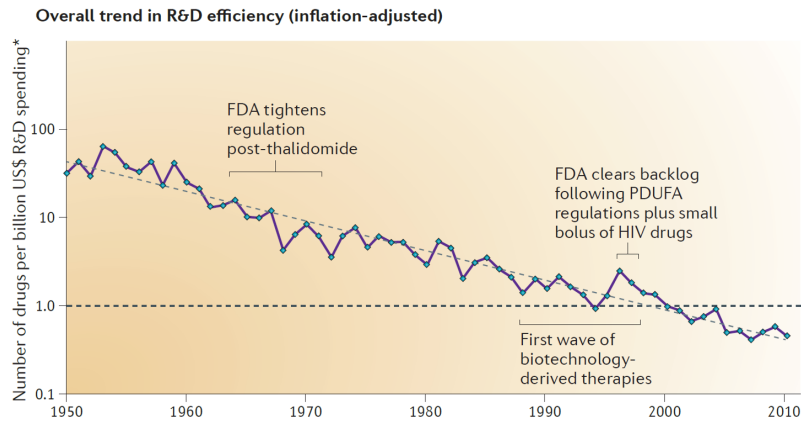


FIGURE 1 – Loi d’Eroom dans la R&D pharmaceutique : le nombre de médicaments approuvés par la FDA par milliard de dollars dépensés dans la R&D diminue de moitié tous les 9 ans [5].

désavantage des cultures 2D est l’utilisation d’un seul type cellulaire, avec parfois des cellules complémentaires, qui ne permet pas d’obtenir le phénotype des cellules dans le tissu ciblé [6, 7]. Les cellules cultivées sont généralement immatures, possèdent une durée de vie limitée, et ne développent pas leur fonction *in vivo*. Ces limites rendent la prédiction de la réponse des cellules dans le tissu fonctionnel très compliquée [8]. De même, les modèles animaux ne représentent pas des candidats aux tests de médicaments crédibles à cause des différences génétiques avec l’homme. Les méthodes actuelles ne sont donc pas capables de prédire de manière fiable la réponse humaine au nouveau médicament.

Ceci explique que deux tiers des sommes investies pour le développement d’une molécule le sont durant les essais cliniques [9]. Ainsi, les entreprises pharmaceutiques recherchent activement des techniques de tests plus prédictives afin de déceler l’échec des médicaments plus tôt, et donc augmenter la rentabilité de leurs produits. D’un point de vue éthique, des plateformes de tests plus prédictives amélioreraient également la pertinence des nouvelles molécules retenues lors de la phase de tests pré-cliniques et renforceraient l’efficacité des médicaments testés sur les patients lors des essais cliniques.

L’industrie pharmaceutique n’est pas la seule à la recherche de telles solutions. En effet, l’Europe et d’autres régions du monde, ont interdit les tests de toxicité sur les animaux dans le domaine des cosmétiques, de l’agro-alimentaire et des biens de consommations. Des projets d’interdiction sont également en cours dans plusieurs autres pays, notamment les Etats-Unis. Ces industries recherchent donc des substituts aux animaux afin de tester leurs produits.

Actuellement, l’alternative la plus encourageante et la plus pertinente aux tests animaux sont les organes-sur-puces (OoCs).

Les OoCs : des plateformes de tests de médicaments

Les OoCs sont des modèles de physiologie humaine *in vitro*, conçus par micro-ingénierie, au sein d'une puce microfluidique. Ce sont des dispositifs de culture de cellules humaines au sein de structures tridimensionnelles reproduisant l'environnement extracellulaire *in vivo* d'un organe donné [10]. Par rapport à la culture cellulaire sur boîte de Pétri, les OoCs reproduisent les signaux moléculaires, structurels et physiques influençant le phénotype des cellules cultivées afin qu'elles adoptent leur conformation et leur fonction *in vivo*. Ils tirent parti des avantages de la microfluidique, soit la miniaturisation et l'intégration, afin de contrôler précisément plusieurs paramètres influençant la fonctionnalité des cellules. Les gradients de concentration, la force de cisaillement, la configuration des cellules, les interfaces entre tissus et les interactions entre organes sont autant de paramètres contrôlés. Ces paramètres jouent un rôle sur le phénotype cellulaire et permettent de mimer la structure complexe et le microenvironnement tissulaire afin de reconstruire la fonction physiologique *in vivo* de l'organe humain d'intérêt.

Alors que l'ingénierie tissulaire vise à reproduire des tissus et organes fonctionnels, le domaine des organes-sur-puces se veut moins ambitieux et vise à développer des fonctionnalités de tissus ou d'organes dans le but d'étudier ces organes et d'analyser l'influence de nouveaux médicaments potentiels sur ses fonctions. On devrait ainsi plutôt parler de fonctionnalités d'organe-sur-puce plutôt que d'organe-sur-puce. Certaines personnes préfèrent notamment parler de systèmes microphysiologiques (MPs), terme plus juste quant à la description du système. On peut donc voir le domaine des OoCs comme une sous-branche de l'ingénierie tissulaire. Les OoCs sont développés afin de pallier l'absence de plateformes de tests de médicaments fiables.

Cependant, un organe-sur-puce ne permet pas encore la reproduction d'un organe total. Dans le corps humain, chaque organe est un ensemble complexe composé de nombreux tissus fortement imbriqués assurant des fonctions spécifiques. De plus, les organes interagissent entre eux via le réseau sanguin. Les tests sur animaux permettent de prendre en compte ces complexités, mais ils souffrent des différences génétiques et phénotypiques avec l'homme. A l'inverse, les OoCs bénéficient de l'utilisation de cellules humaines, donc de phénotypes cellulaires semblables, mais manque de complexité, bien que l'on commence à voir apparaître des puces multi-organes (humain-sur-puce). Il faut donc voir actuellement les OoCs comme des plateformes de tests de médicaments complémentaires aux tests animaux. Ils permettent d'anticiper la réponse de la fonction développée de l'organe à un médicament.

En revanche, la simplicité des OoCs apporte des avantages de coûts, de précisions, d'adaptabilité et de manipulation que n'offrent pas les modèles animaux. Il est ainsi plus facile de réaliser de nombreux tests sur de tels systèmes que sur des modèles animaux, d'où l'attraction des entreprises pharmaceutiques pour ces dispositifs.

Les enjeux de l'ingénierie tissulaire

Que ce soit pour le domaine des organes-sur-puces ou celui de l'ingénierie tissulaire, l'objectif est de reproduire une partie ou la totalité d'un organe. Pour cela, le microen-

vironnement des tissus doit être reproduit au plus proche afin que les cellules adoptent leur conformation *in vivo*. Un maximum des composantes des tissus doivent alors être intégrées et un maximum des signaux chimiques et physiques doivent être reproduits afin de reconstruire l'environnement *in vivo*.

Or les tissus humains sont constitués majoritairement de 3 composants essentiels : des cellules assurant la fonction du tissu, une matrice extracellulaire offrant une structure de développement aux cellules et apportant des signaux biochimiques et physiques essentiels à la bonne fonctionnalité des cellules, et un réseau vasculaire perfusant le tissu et alimentant les cellules en oxygène et nutriments tout en évacuant les déchets cellulaires sécrétés. La plupart des constructions tissulaires actuelles consistent en la culture de cellules au sein d'un matériau présentant des propriétés de la matrice extracellulaire mais n'intègrent pas de réseau vasculaire essentiel à l'adoption de la fonctionnalité du tissu *in vivo* [11]. Ainsi, toutes les constructions épaisses ne présentent pas un approvisionnement des cellules au sein du tissu. Le réseau vasculaire joue un rôle essentiel dans la fonctionnalité des tissus et son développement et intégration dans les modèles de tissus *in vitro* sont primordiaux afin de développer des tissus ou organes physiologiques fonctionnels [12].

De nombreuses équipes travaillent au développement de réseaux vasculaires perfusant des constructions tissulaires épaisses. Néanmoins à ce jour, aucune réalisation n'a pu démontrer le développement d'un réseau de capillaires sanguins physiologiques et perfusables intégrant un modèle tissulaire épais. Dans cette thèse, une stratégie permettant d'intégrer un tel réseau au sein d'une macroconstruction tissulaire est imaginée et réalisée. Cette stratégie consiste en l'empilement de micro-unités tissulaires formant une macrostructure poreuse au sein de laquelle des capillaires sanguins sont formés. Ces micro-unités sont constituées d'un matériau représentatif de la matrice extracellulaire et de cellules du tissu d'intérêt. Cette technique promet l'assemblage rapide de l'ensemble des composants d'un tissu au sein d'une construction épaisse.

Ce manuscrit présente l'ensemble du développement de notre dispositif de construction de tissu épais vascularisé. Une première partie présente un état de l'art non-exhaustif de l'ensemble des réalisations de réseaux microvasculaires présentées dans la littérature. Ensuite, le projet de la thèse et les spécificités de notre technique imaginée sont expliqués, suivis de trois chapitres détaillant les étapes successives réalisées nécessaires au développement du réseau microvasculaire. Un premier chapitre montre la conception des micro-unités tissulaires. Le deuxième chapitre se concentre sur la caractérisation des écoulements fluidiques au sein de notre structure et le troisième chapitre montre les réalisations finales de développement du tissu ainsi que les expériences de caractérisation du réseau capillaire. Un résumé des résultats obtenus et des conclusions tirées est ensuite proposé ainsi qu'une discussion sur l'évolution des travaux et les perspectives.

Chapitre 1

Etat de l'art

1.1 L'environnement tissulaire

1.1.1 Les tissus conjonctifs

Un tissu est un ensemble de cellules nettement délimitées possédant la même organisation et concourant à la même fonction. Il existe différents types de tissus et les tissus conjonctifs sont les plus présents dans l'organisme. Les tissus conjonctifs ont pour rôle initial de lier et soutenir les autres constituants de l'organisme humain, mais ils acquièrent également des propriétés supplémentaires selon leur localisation et les cellules auxquelles ils sont associés. Ainsi, on dénote 7 familles de tissus conjonctifs : les tissus conjonctifs lâches, denses, adipeux, élastiques, réticulés, cartilagineux et osseux. Chaque catégorie de tissu présente une morphologie et une fonctionnalité différente. Cependant, leur composition de base est similaire. Ils sont constitués de cellules non jointives contenues dans un réseau de macromolécules : la matrice extracellulaire (ECM), également appelée matrice interstitielle.

L'ECM est la composante non-cellularisée du tissu offrant un support aux cellules du tissu et joue un rôle dans la régulation des fonctions cellulaires, la différenciation et la prolifération [13]. Chaque ECM est composée d'un réseau de fibres et de substance fondamentale. La substance fondamentale contient de l'eau, des protéines et des polysaccharides. Elle comble l'espace interstitiel du réseau fibreux, permet l'absorption des chocs reçus par le tissu et transporte les molécules solubles.

L'ECM diffère dans chaque tissu et varie selon sa composition. Quatre classes majeures de macromolécules la composent [14] :

- Les collagènes : protéines fibreuses assurant la cohésion, l'élasticité et la régénération des tissus. Elles permettent au tissu de résister aux forces de traction. Ces protéines sont les plus abondantes des organismes animaux : elles représentent un quart de la masse protéique.
- L'élastine : protéine fibreuse offrant l'élasticité au tissu.
- Les glycoprotéines : molécules régulant l'attachement, les fonctions et la migration

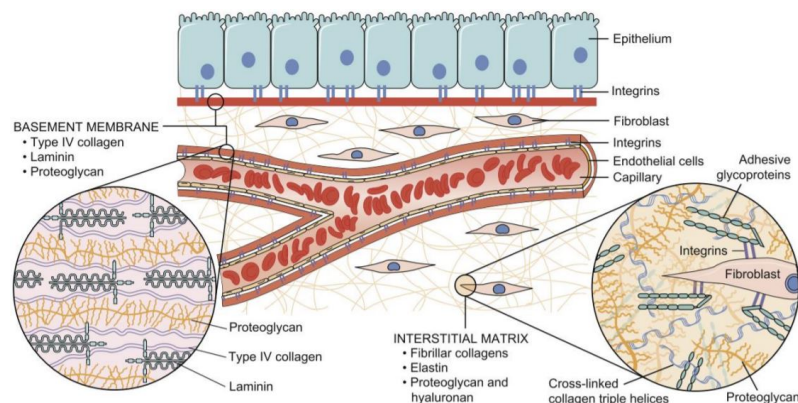


FIGURE 1.1 – Schéma de la matrice extracellulaire. [17]

des cellules. Les fibronectines et les laminines font partie de cette classe.

- Les protéoglycanes : molécules formant des hydrogels comblant l’espace interstitiel extracellulaire et permettant à l’ECM de résister à de fortes forces de compression [15].

L’ECM est donc un environnement dense (Figure 1.1) et confère les propriétés mécaniques au tissu comme l’élasticité ou la résistance aux forces de tension et compression. Järveläinen *et al.* détaillent précisément les différentes molécules contenues dans la matrice extracellulaire, leurs rôles et leurs implications dans les pathologies [16].

Deux types de cellules peuplent l’ECM des tissus conjonctifs : les cellules souches mésenchymateuses (MSC pour Mesenchymal Stem Cells) et les fibroblastes. Les cellules souches mésenchymateuses sont présentes en faible quantité chez l’adulte et sont surtout abondantes chez l’embryon. Ces cellules sont non différenciées. Lors du développement, elles peuvent se différencier en fibroblastes, en cellules sanguines ou en cellules tissulaires fonctionnelles. Par exemple, elles peuvent se transformer en ostéoblastes (os), en chondrocytes (cartilage), en myocytes (muscles) ou en adipocytes (moelle). Elles peuvent également se différencier en péricytes et envelopper les capillaires sanguins. Les fibroblastes sont des cellules de soutien sécrétant les protéines formant l’ECM afin de contrebalancer sa dégradation par des enzymes : l’ECM est ainsi un environnement dynamique en constant renouvellement. Les constituants de l’ECM sont sécrétés, entre autres, par les fibroblastes, excepté pour le cartilage et les os où ils sont sécrétés par les chondroblastes et les ostéoblastes, respectivement. La rupture de cet équilibre conduit à des pathologies comme la fibrose (causée par une accumulation de matrice), l’arthrose ou encore l’emphysème pulmonaire (dû à une destruction matricielle).

L’ECM remplit de nombreuses fonctions et contribue à l’homéostasie des tissus (Figure 1.2). Rozario et De Simone présentent les différentes fonctions de l’ECM dans leurs travaux [18]. La complexité de l’ECM influence le phénotype des cellules tissulaires. Pour développer un tissu fonctionnel, il est essentiel de reproduire au mieux l’environnement mécanique et biochimique afin que les cellules adoptent leur fonction *in vivo*. Pour cela,

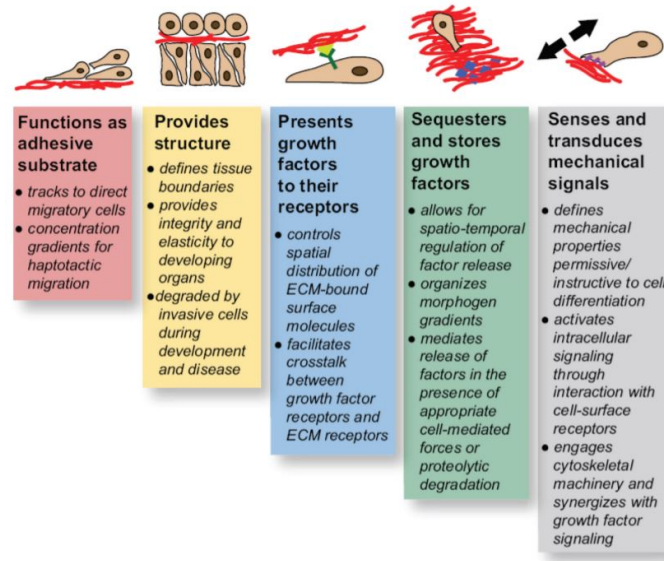


FIGURE 1.2 – Résumé des fonctions de la matrice extracellulaire. [18]

un maximum des composés et des signaux *in vivo* doivent être intégrés afin de recréer au mieux l'équilibre du tissu conçu. Des cellules souches mésenchymateuses ou des fibroblastes sont généralement cultivés au sein d'une structure 3D représentative de l'ECM. Les biopolymères sont utilisés en tant que support représentatif de l'ECM.

1.1.2 Les biopolymères *in vitro*

La conception de tissus *in vitro* repose sur l'association d'échafaudages en 3 dimensions et de cellules afin de favoriser la croissance, l'organisation et la différenciation cellulaire. Des structures sont conçues à partir de biopolymères afin de reproduire la matrice extracellulaire du tissu et fournir un environnement de culture aux cellules proche de celui rencontré *in vivo*. De nombreux biopolymères sont utilisés en ingénierie tissulaire.

Ces biomatériaux doivent posséder certaines caractéristiques essentielles. Indéniablement, le biomatériau doit être biocompatible et non cytotoxique afin de ne pas causer de dommages aux cellules [19]. De plus, les propriétés mécaniques de la structure doivent correspondre au maximum à celles *in vivo* afin de servir de support aux cellules en culture. Le biomatériau doit également être poreux et posséder une porosité suffisante pour permettre la diffusion et le transport de molécules solubles au travers de l'échafaudage. Enfin, pour concevoir un tissu fonctionnel à long-terme, les cellules en culture doivent s'auto-arranger et produire leur propre microenvironnement afin de maintenir la fonction développée. Le biomatériau doit donc rester intègre afin de permettre aux cellules de s'organiser, de communiquer entre elles et de se différencier. Idéalement, ce biomatériau doit se détériorer une fois la fonction du tissu établie.

De nombreux biopolymères, remplissant certaines ou toutes de ces fonctions, sont utilisés pour la conception de tissus. Ces biomatériaux sont généralement classés en deux

catégories : les biomatériaux naturels et les biomatériaux synthétiques.

Les biomatériaux naturels

Cette catégorie désigne les biomatériaux provenant de source naturelle. Les biomatériaux naturels sont extraits d’organismes vivants et leur dégradation résulte en des produits non toxiques pour les cellules. Parmi les biomatériaux provenant de l’ECM, on retrouve le collagène, la fibrine et l’acide hyaluronique. D’autres biomatériaux biocompatibles proviennent d’autres sources naturelles comme le chitosane, la gélatine ou l’alginate. La plupart des biomatériaux naturels permettent la construction d’environnements favorables à la culture cellulaire car ils possèdent des sites d’adhésions aux cellules et maintiennent la différenciation. De plus, ils engendrent généralement une faible réponse du système immunitaire ce qui rend possible leur utilisation *in vivo*.

Bien que leur provenance offre une meilleure compatibilité aux cellules, certains désavantages accompagnent l’utilisation de biomatériaux naturels. Tout d’abord, les différences génétiques entre les individus engendrent des différences entre les matrices extracellulaires d’un individu à un autre, résultant en des variations en terme de composition et de propriétés mécaniques entre les lots de biomatériaux extraits. De plus, les processus de récupération, purification et stérilisation des biomatériaux naturels sont complexes et peuvent provoquer des dégradations protéiques. Enfin, la dégradation et les propriétés physiques de ces biopolymères sont difficilement contrôlables.

Les biomatériaux synthétiques

Afin de palier les désavantages liés à l’utilisation de biomatériaux naturels, des biomatériaux synthétiques ont été conçus. La synthèse de biomatériaux apporte un contrôle des propriétés chimiques et physiques afin de reproduire les propriétés *in vivo*. De plus, les procédés de fabrication de biomatériaux synthétiques sont standardisés ce qui offre une reproductibilité entre les lots améliorée vis-à-vis des biopolymères naturels. Cependant, des modifications de la surface des biomatériaux synthétiques doivent être réalisées car ils ne possèdent pas de sites d’adhésion pour les cellules. Ainsi, des modifications chimiques sont généralement appliquées par recouvrement avec de la laminine ou de la fibronectine, ou par greffage de séquences peptidiques Arg-Gly-Asp reconnues par l’intégrine des cellules. D’autres molécules peuvent être greffées au substrat de culture afin d’apporter des signaux aux cellules, comme des facteurs de croissance angiogénique par exemple. De plus, les procédés de conception de biomatériaux synthétiques impliquent généralement l’utilisation de solvants toxiques qui peuvent altérer la viabilité des cellules [20].

Griffith et Swartz présentent les différentes composantes de l’ECM *in vivo* et des biomatériaux synthétiques équivalents [21]. Les polyesters voient un intérêt récent d’intégration au sein de constructions tissulaires. Cette famille d’hydrogels est compatible avec les techniques de conception d’échafaudage de moulage et de lithographie. De plus, les polyesters présentent de bonnes propriétés élastiques. Parmi les différents polyesters, on retrouve majoritairement le PLA (pour poly(lactic acid)) [22], le PGA (pour poly(glycolic acid)), le PLGA (pour poly(lactic-co-glycolic acid)) [23] ou encore le POMAC (pour

poly(octamethylene maleate (anhydride) citrate)) [24] qui ont été utilisés dans la conception d'organes-sur-puces.

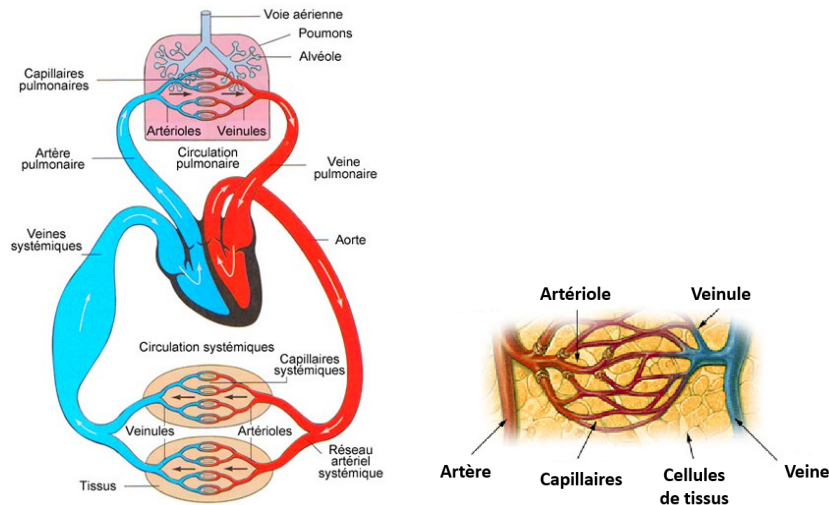
De nombreuses revues complètes présentent en détail les différents biomatériaux et des exemples d'utilisation de ces biopolymères dans des technologies d'organe-sur-puces ou d'ingénierie tissulaire [11, 25, 26, 27]. Li *et al.* détaillent les biomatériaux spécifiquement utilisés pour les techniques de bioimpression [28]. Les avantages et inconvénients de chaque biopolymère spécifique sont explicités dans ces publications. Ahadian et Radisic présentent notamment un tableau récapitulatif précis des forces et faiblesses de chacun des biomatériaux utilisés dans les technologies d'organes-sur-puces [11].

1.2 Le réseau vasculaire

In vivo, la quasi-totalité des tissus est perfusée par le réseau vasculaire. Décrite pour la première fois en 1628 par le médecin anglais William Harvey, la circulation sanguine distribue aux cellules de l'organisme le sang riche en oxygène, nutriments et molécules et évacue les déchets cellulaires et le dioxyde de carbone produits. Elle assure également la régulation de la chaleur de l'organisme. Elle comprend plus de 100.000 km de vaisseaux interconnectés pour une surface de plus de 4000 m² [29, 30]. Ce réseau est complexe et ramifié (Figure 1.3). Du cœur partent les artères, vaisseaux à paroi épaisse, transportant le sang oxygéné et les nutriments vers les tissus et cellules. Elles se subdivisent en artérioles puis en capillaires, pénétrant les tissus et organes. La paroi des capillaires est fine et permet la diffusion de l'oxygène, des nutriments et de certaines molécules du sang vers les cellules, ainsi que le transfert du dioxyde de carbone et des déchets cellulaires des cellules vers le sang. Les capillaires se ramifient ensuite en veinules puis en veines pour assurer le retour du sang chargé en gaz carbonique des organes vers le cœur. Sans cet apport en oxygène, les tissus subiraient à terme une nécrose.

1.2.1 Caractéristiques du réseau microvasculaire

Le réseau capillaire est dense : chaque cellule d'un tissu vascularisé se situe à moins de 200 μm d'un capillaire sanguin afin d'accéder à l'oxygène transporté par le sang [31]. En effet, la limite de diffusion de l'oxygène au sein d'un tissu est inférieure à 200 μm d'après la loi de Fick [12]. Sans oxygène, les cellules nécrosent. De ce fait, toute construction de tissu ou d'organes d'épaisseur supérieure à 200 μm se doit d'être vascularisée. En réalité, les tissus développés *in vitro* par ingénierie tissulaire possèdent généralement une densité plus faible que les tissus *in vivo* ce qui permet la diffusion de l'oxygène sur une épaisseur plus importante. C'est la raison pour laquelle les modèles de culture 3D comme les sphéroïdes, les organes-sur-puces ou les produits de l'ingénierie tissulaire n'incluant pas de modèles de vascularisation ne dépassent généralement pas une épaisseur de plus de 500 μm [32]. Les seuls modèles de tissus ou d'organes épais conçus par ingénierie tissulaire sont non-vascularisés, comme la peau, les cartilages, la cornée [33, 34]. L'inclusion d'un réseau



(a) Réseau vasculaire global.
<http://www.nataswim.info/en/error-404/128-dossier/7819-courir-systemes-cardio-vasculaire>.

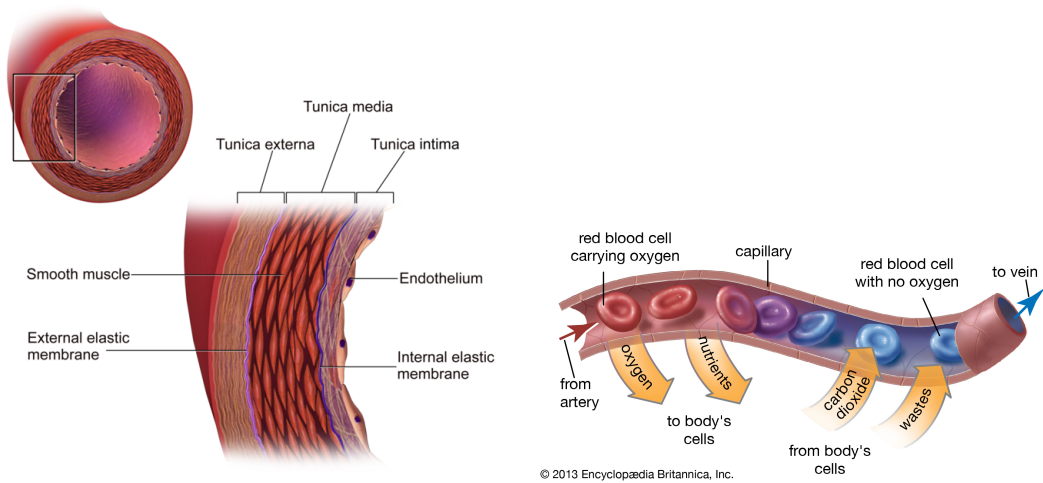
(b) Réseau de capillaires perfusant les tissus et organes.
<https://courses.lumenlearning.com/boundless-ap/chapter/arteries/>.

FIGURE 1.3 – Schémas de la circulation sanguine.

vasculaire au sein des tissus développés est nécessaire et reste un des défis primordiaux au développement de tissus et organes fonctionnels [12].

Chaque type de vaisseau sanguin (artères, artérioles, capillaires, veinules et veines) possède une paroi différente. Les veines et artères sont les vaisseaux les plus larges (leur diamètre moyen est d’approximativement 1 mm) et leur membrane est imperméable aux composants du sang. La paroi des artères est cependant plus épaisse car, comme elles transportent le sang du cœur vers les organes, elles doivent résister à des pressions plus importantes que dans les veines. Le débit sanguin atteint des vitesses de plus de 40 cm/s dans ces vaisseaux. Ces vaisseaux sont constitués de trois couches principales, qui forment la tunique (Figure 1.4a). La tunique interne (intima) est, comme son nom l’indique, la couche interne des vaisseaux. Elle est la plus fine et est constituée d’une couche unique de cellules endothéliales (ECs pour Endothelial Cells) fortement imbriquées les unes dans les autres qui forment une paroi étanche : l’endothélium. L’endothélium repose sur une fine couche d’élastine : la limitante élastique interne. La tunique moyenne (media) est une couche plus épaisse constituée de plusieurs couches de cellules de muscles lisses séparées entre elles par une matrice extracellulaire de collagène et d’élastine. Le nombre de ces couches varie selon les artères. Cet ensemble de couches concentriques repose lui aussi sur une nouvelle lame d’élastine : la limitante élastique externe. La tunique externe (adventice) est un mur de tissus connectifs, riches en collagène et fibres élastiques. Elle permet l’attache de l’artère aux tissus avoisinants.

Les capillaires sanguins sont composés de cellules endothéliales. Les cellules endothé-



(a) Les différents vaisseaux du réseau vasculaire et leurs différentes parois. [35] (b) Capillaire transportant des globules rouges.

FIGURE 1.4

liales sont fines, allongées et alignées dans la direction du flux (orientées dans le sens contraire au flux). Elles sont étroitement liées entre elles et adhèrent fermement les unes aux autres pour former la couche continue enveloppant la surface luminale des capillaires sanguins : l'endothélium. Le diamètre des capillaires peut varier entre 3 et 20 μm . Les plus petits capillaires permettent le passage d'un seul globule rouge, dont le diamètre moyen est de 7,2 μm de moyenne mais peut se déformer énormément (Figure 1.4b). L'endothélium interagit directement avec le flux sanguin et joue un rôle de membrane sélective. Le faible diamètre des capillaires combiné à une fine épaisseur de parois et un débit sanguin faible (environ 0.07 cm/s) permet la diffusion des composants du sang vers les tissus avoisinants et inversement. La dynamique des échanges au niveau des capillaires suit la loi de Starling (Figure 1.5). La pression osmotique est la pression minimum nécessaire pour empêcher les molécules de diffuser d'une solution à une autre. Au niveau des pôles artériels des capillaires, la pression hydrostatique du sang est plus forte que la pression osmotique du liquide interstitiel des tissus ce qui favorise la diffusion de l'eau, de l'oxygène et des nutriments du plasma vers les cellules des tissus : c'est la filtration. Au niveau des pôles veineux des capillaires, la pression osmotique colloïdale importante favorise, au contraire, la diffusion de liquide depuis les tissus vers les capillaires : c'est la réabsorption. En conséquence de la loi de Fick de diffusion de l'oxygène jusqu'à 200 μm dans les tissus, les capillaires sont proches les uns des autres et ce réseau représente la majorité de la circulation sanguine en termes de surface (Figure 1.6). L'endothélium ne sert pas uniquement de barrière perméable sélective, il occupe également d'autres fonctions : régulation de la pression sanguine, promotion de l'angiogenèse (formation de nouveaux vaisseaux) ou encore prévention de la formation de caillots.

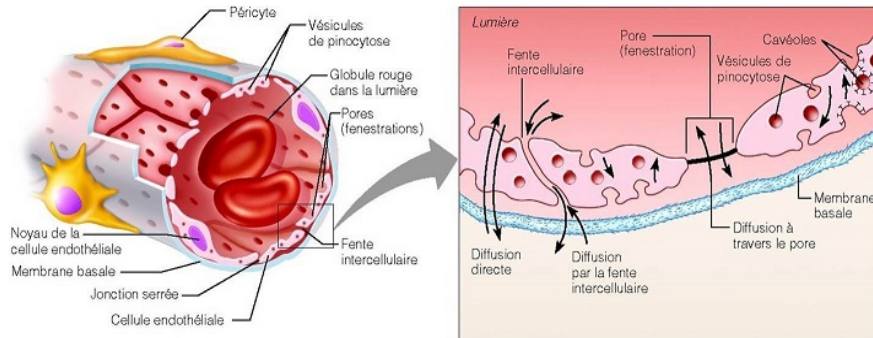


FIGURE 1.5 – Les différents types de diffusions au travers de l’endothélium des capillaires sanguins. (<http://amar-constantine.e-monsite.com/pages/cours-pour-autres-specialites/anatomie-physiologie/systeme-cardiovasculaire.html>)

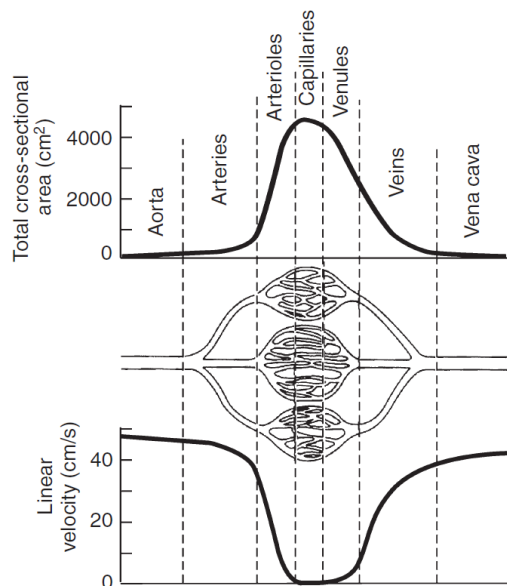


FIGURE 1.6 – Superficie du réseau vasculaire. Valeurs estimées de la superficie de chaque type de vaisseaux (haut) et vitesse du sang dans ces vaisseaux (bas). Tiré de Physiology et Biophysics, Vol.2, 20ème édition, E.O.Feigl, p.10-22.

1.2.2 La complexité de l'endothélium

En biologie, on appelle parenchyme le tissu d'un organe ayant la fonction principale (par exemple les alvéoles dans le cas du poumon); il s'oppose au stroma qui désigne les tissus nutritifs ou de soutien (par exemple les tissus conjonctifs). L'endothélium sécrète des signaux paracrines (agissant sur les cellules avoisinantes) pour les cellules parenchymateuses [36]. Il permet aussi la régulation des fonctions de l'organe, le contrôle du microenvironnement et peut intervenir dans la régénération des tissus. Le réseau microvasculaire joue donc de nombreux rôles et maintient l'homéostasie des organes.

De plus, chaque organe possède une fonction différente et a donc des besoins métaboliques, biochimiques ou immunologiques différents. Le réseau microvasculaire s'adapte à ces besoins. Ainsi, le réseau microvasculaire est différent dans chaque organe : la configuration des capillaires dans le foie est sensiblement différente de celle dans le cerveau ou les poumons. Les cellules endothéliales « ont appris à se comporter différemment dans chaque organe et s'adaptent aux besoins de ces organes », pour reprendre les propos du Dr Michael Ginsberg, chercheur au Howard Hughes Medical Institute. Le laboratoire de S. Rafii du même institut a démontré cette adaptation : les cellules endothéliales de chaque organe portent des séquences uniques de gènes codant pour des facteurs de croissance paracrine, des molécules d'adhésion et des facteurs de régulation du métabolisme, spécifiques au tissu perfusé [37]. W. Aird compare les différences phénotypiques de l'endothélium de différents organes dans sa publication *Phenotypic Heterogeneity of the Endothelium* [38, 39].

Le réseau capillaire est essentiel pour maintenir l'homéostasie des organes. Son dysfonctionnement ou sa malformation est notamment observé dans la plupart des maladies. C'est pourquoi les organes-sur-puces ou systèmes microphysiologiques cherchent à reproduire le système microvasculaire dont l'influence est primordiale pour le fonctionnement des organes. Certains organes-sur-puces se concentrent uniquement sur le développement des pathologies de l'endothélium, quand la plupart cherchent à inclure l'endothélium dans des modèles d'organes pour étudier les fonctions microvasculaires spécifiques à chaque organe.

De par leurs fonctions, les cellules endothéliales sont très variables et s'adaptent facilement à leur microenvironnement. Par exemple, Chang *et al.* met en avant la différence de phénotype de cellules endothéliales selon la rigidité du substrat sur lequel elles adhèrent et les signaux biochimiques appliqués [40]. Cela rend leur étude compliquée car le phénotype des cellules endothéliales *in vivo* ne peut être prédit en analysant une culture de cellules endothéliales seules dans un milieu isolé. Hors de leur environnement naturel, les cellules endothéliales ne possèdent pas leur comportement *in vivo*. Il est donc nécessaire de recréer des systèmes microphysiologiques mimant au mieux le microenvironnement d'un tissu afin que les cellules endothéliales adoptent leur phénotype *in vivo*.

1.3 Les techniques de vascularisation *in vitro*

Le premier développement d’un réseau microvasculaire *in vitro* peut être attribué à J.Folkman et C.Haudenschild et date de 1980 [41]. En cultivant des cellules endothéliales dans un milieu tumoral, ils ont observé la formation spontanée de tubes capillaires. Aujourd’hui, plusieurs reproductions de réseaux vasculaires ont été développées en utilisant différentes stratégies. De par les faibles dimensions associées aux vaisseaux sanguins, ces stratégies reposent généralement sur la microfluidique et ses nombreux avantages. Les systèmes microfluidiques permettent l’application d’un flux contrôlé au sein des microcanaux, la génération de gradients biochimiques, ainsi que la co-culture de cellules, stimuli connus pour influencer grandement le phénotype des cellules endothéliales [42]. Ils bénéficient également de la manipulation de faibles volumes de réactifs, l’accessibilité des techniques de fabrication de ces systèmes et l’implémentation dans des matériaux transparents rendant possible l’observation optique [43].

Afin de recréer un réseau microvasculaire *in vitro* perfusant un tissu, les caractéristiques principales des capillaires doivent être reproduites : le flux et les forces de cisaillement au niveau des parois, la fonction de barrière sélective et les interactions avec les cellules parenchymateuses. De nombreux systèmes ont été développés afin de concevoir un réseau microvasculaire perfusable, l’enjeu est maintenant d’intégrer ce réseau de capillaires au sein des constructions tissulaires. Plusieurs revues récentes présentent ces systèmes de développement d’une vascularisation [44, 45, 46, 47, 48, 49, 50]. Chacune de ces publications adopte sa propre classification des techniques de développement d’un réseau microvasculaire. Nous présentons les stratégies de formation d’un réseau vasculaire dans la partie qui suit et effectuons un regroupement des différentes méthodes de vascularisation en trois catégories : l’auto-assemblage, les fabrications soustractives et les fabrications additives.

1.3.1 L’auto-assemblage

L’approche d’auto-assemblage tire parti de la capacité des cellules endothéliales de s’auto-arranger en un réseau microvasculaire. Les cellules endothéliales sont cultivées dans un micro-environnement favorisant leur développement et leur auto-organisation en un réseau tubulaire. Cette méthode reproduit les étapes de formation d’un réseau sanguin *in vivo*, le réseau obtenu est ainsi plus physiologique qu’avec les autres techniques de vascularisation.

L’auto-assemblage reproduit un des processus de développement de vaisseaux sanguins *in vivo* : la vasculogénèse et l’angiogénèse (Figure 1.7) [51]. La vasculogénèse est la migration, la différenciation et l’association des cellules progénitrices vasculaires formant le réseau primitif de structures vasculaires. Ce procédé se produit majoritairement durant les premières étapes de l’embryogénèse, mais également chez l’Homme adulte via le recrutement de cellules endothéliales par la moelle épinière [52]. L’angiogénèse réfère à la croissance de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de l’arbre vasculaire pré-existant [53]. C’est le bourgeonnement de nouveaux vaisseaux à partir de capillaires. Elle répond à

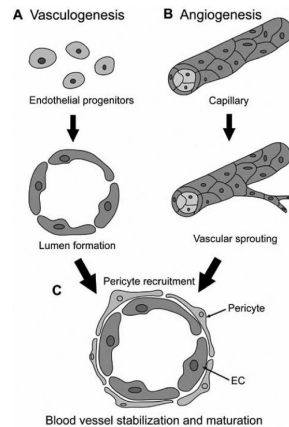


FIGURE 1.7 – Principe d’angiogénèse et de vasculogénèse [55].

des signaux émis par les tissus parenchymateux sous certaines conditions physiologiques. L’angiogénèse est entre autre observée lors de la croissance tumorale ou la cicatrisation de plaies [54].

Un modèle d’angiogénèse ou de vasculogénèse peut être reproduit afin de développer un réseau microvasculaire auto-assemblé. La vasculogénèse est reproduite en cultivant des cellules endothéliales dispersées au sein d’un hydrogel et en appliquant des stimuli biochimiques ou mécaniques afin de favoriser l’auto-organisation des cellules endothéliales en un réseau tubulaire creux. Le modèle d’angiogénèse est lui développé en cultivant des cellules endothéliales à la surface d’un hydrogel et en favorisant le développement des cellules endothéliales qui envahissent l’hydrogel. Les stimuli biochimiques sont généralement appliqués par co-culture de cellules du stroma : les fibroblastes. En effet les fibroblastes ont la capacité de sécréter une variété de facteurs de croissance vasculaires lorsqu’elles sont cultivées avec des cellules endothéliales [56, 57, 58]. Il est possible de se passer de la co-culture de fibroblastes en perfusant directement des facteurs de croissance, comme le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), dans le milieu de culture.

L’équipe de Kim a pu développer le processus d’angiogénèse et de vasculogénèse au sein d’une même puce microfluidique [59] (Figure 1.8). Cette puce contient 5 compartiments microfluidiques : une chambre centrale de formation du réseau vasculaire, 2 chambres latérales de culture de cellules stimulant la formation du réseau et 2 canaux intermédiaires de perfusion séparant les chambres de culture (Figure 1.8(a)). Chaque canal est séparé de son voisin par des piliers. La vasculogénèse est reproduite en cultivant des cellules endothéliales incluses dans un gel de fibrinogène et de collagène, dans la chambre centrale, et est stimulée par la culture de fibroblastes dans les deux chambres latérales. Un réseau perfusable est ainsi formé en 4 jours (Figure 1.8(b)A,B,C,D & 1.8(c)A). Pour le modèle d’angiogénèse, la chambre centrale est remplie du même gel ne contenant pas les cellules endothéliales. Ces cellules sont déposées sur la paroi d’un côté de la chambre, et les fi-

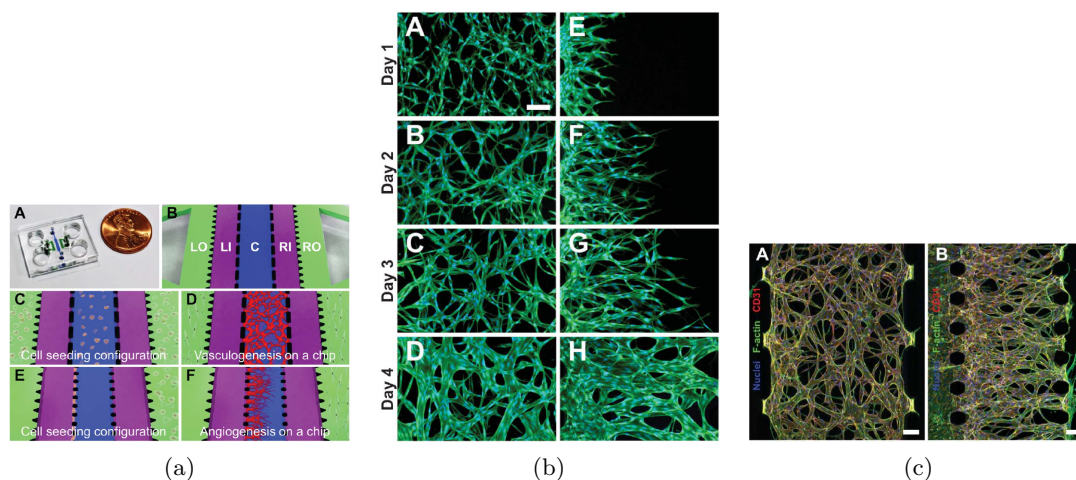


FIGURE 1.8 – Modèle de développement d’un réseau vasculaire par angiogénèse et vasculogénèse. [59]

(a) A & B. Photographie de la puce microfluidique comportant une chambre centrale de culture des ECs et deux chambres latérales de culture des fibroblastes (LO & RO) séparées par deux canaux de perfusion (LI & RI). C & D. Modèle de vasculogénèse. E & F. Modèle d’angiogénèse. (b) A, B, C & D. Evolution du développement du réseau vasculaire dans le cas du modèle de vasculogénèse. E, F, G & H. Evolution du réseau microvasculaire dans le cas du modèle d’angiogénèse (barre d’échelle = 100 μm). (c) A. Réseau microvasculaire formé au bout de 4 jours dans le cas du modèle de vasculogénèse. B. Réseau microvasculaire formé au bout de 4 jours dans le cas du modèle d’angiogénèse (barre d’échelle = 100 μm).

broblastes sont cultivés dans la chambre latérale opposée à cette paroi. Durant la culture, les fibroblastes vont sécréter les facteurs de croissance qui vont attirer l’elongation des vaisseaux vers eux. Au bout de 4 jours, les capillaires ont proliféré sur les 700 μm de largeur de la chambre (Figure 1.8(b)E,F,G,H & 1.8(c)B). L’utilisation de piliers espaçant la chambre de formation du réseau vasculaire et les canaux de perfusion permet l’attache des vaisseaux aux entrées du canal et leur perfusion. Ainsi, ce dispositif a pu être utilisé pour étudier la perméabilité des vaisseaux et la migration transendothéliale de leucocytes, cellules circulant dans le sang.

Whisler *et al.* ont conçu une puce de développement d’un réseau vasculaire similaire à la précédente (Figure 1.9) [60]. A l’image de celle développée par Kim *et al.*, cette puce contient un canal central de développement du réseau et deux chambres latérales de culture des cellules de soutien (Figure 1.9A & B). Cela leur a permis d’étudier l’influence de différents paramètres sur la morphologie du réseau développé. En comparant un réseau développé via la co-culture de cellules endothéliales et de fibroblastes avec un réseau développé sans culture de fibroblastes sous perfusion de facteurs de croissance dans le milieu de culture, ils ont pu montrer que la présence de fibroblastes aidait à la stabilité du réseau microvasculaire développé. Ils ont également observé qu’en combinant des fibroblastes et

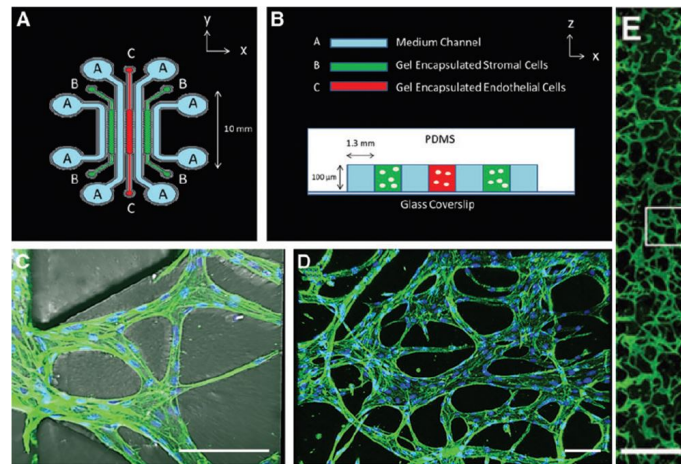


FIGURE 1.9 – Réseau capillaire développé par auto-assemblage de cellules endothéliales. [60]

A & B. Schéma de la chambre microfluidique comportant une chambre centrale de culture des ECs et deux chambres latérales de culture des fibroblastes séparées par deux canaux de perfusion. E. Image de la région vascularisée (barre d'échelle = 1 mm). C. Le réseau développé s'anastomose avec le canal de perfusion grâce à la forme trapézoïdale de la chambre (barre d'échelle = 100 μm). D. Image du réseau microvasculaire développé dans le dispositif (barre d'échelle = 100 μm).

des facteurs de croissance, le réseau présentait plus de branchements mais des longueurs et des diamètres de vaisseaux plus faibles que le réseau obtenu par la seule culture de cellules endothéliales. Leur étude a également démontré l'impact de la rigidité du gel de culture : la longueur des branches et leur diamètre diminuent avec l'augmentation de la concentration, donc de la rigidité, du gel. Enfin, ils ont également montré l'importance de la densité de cellules endothéliales et de fibroblastes sur le développement du réseau vasculaire *in vitro*.

L'équipe de S.George et C.Hugues a également développé une puce microfluidique de formation d'un réseau microvasculaire ayant donné lieu à de nombreuses publications [61, 62, 63, 64]. Cette puce, conçue en PDMS, présente 12 chambres centrales de culture reliées les unes aux autres par un canal large de perfusion (Figure 1.10a). Dans les chambres centrales, des cellules endothéliales et des fibroblastes sont co-cultivés au sein d'un gel de fibrine. Le canal de perfusion relie les 12 entrées des chambres microfluidiques, à l'image d'une artère se divisant pour alimenter chaque tissu, et effectue une boucle reliant les 12 sorties des chambres, à l'image d'une veine circulant entre chaque organe et ramifiant les capillaires. Le flux est généré par différence de pression hydrostatique entre les réservoirs d'entrée et de sortie (Figure 1.10c). Cette configuration génère également des différences de pression entre les entrées et sorties de chaque chambre, ce qui engendre un flux interstitiel au sein de chaque chambre microfluidique. Ce flux interstitiel est contrôlé et varie de 8,5 $\mu\text{m/s}$ pour la première chambre à 0,8 $\mu\text{m/s}$ pour la douzième. Une telle puce per-

met de recréer un réseau sanguin par chambre en deux à trois semaines (Figure 1.10d & 1.10e). Vue du dessus, la chambre adopte une forme de diamant. Cette structure d’élargissement/rétrécissement favorise l’attache du réseau vasculaire avec le canal de perfusion, formant une anastomose (Figure 1.10f & 1.10g). L’anastomose permet ainsi de perfuser le réseau tubulaire formé par injection de composés dans le canal de perfusion. Ainsi, Moya *et al.* ont pu injecter des microbilles fluorescentes dans leur système afin de vérifier la perfusion de leur réseau. De manière intéressante, seules 3 chambres ayant été soumises à un flux interstitiel supraphysiologique (proche de $8,5 \mu\text{m/s}$) ont démontré une perfusion du réseau vasculaire formé. Toutes les autres chambres ont développé un réseau non perfusable. Un tel système permet en plus de vérifier la perméabilité des capillaires formés par injection de particules fluorescentes Dextran 70 kDa et 150 kDa. Là encore, il est intéressant de noter que tous les réseaux se sont avérés imperméables à la particule 150 kDa mais n’ont pas présenté la même perméabilité au 70 kDa. Ce système permet ainsi d’étudier l’influence du flux interstitiel sur le développement du réseau vasculaire. Cette puce a mené à de nombreuses publications et peut être utilisée pour l’étude de la vascularisation ou en tant que plateforme de tests de médicaments. Notamment, Sobrino *et al.* ont développé une tumeur-sur-puce à partir de ce modèle et ont vérifié la bonne réponse de la tumeur développée aux thérapies standards (croissance réduite et/ou régression de la tumeur) [65]. Un tel dispositif peut ainsi permettre de tester les effets de différentes molécules sur le phénotype de la tumeur. Il est également envisageable de développer une plateforme de test personnalisée au patient en cultivant une des cellules tumorales prélevées par biopsie sur le patient, et tester directement les traitements sur cette plateforme.

De telles plateformes de développement de réseau microvasculaire sont généralement utilisées afin d’étudier le développement et l’homéostasie du système microvasculaire. De nombreux systèmes microfluidiques reprenant les principes de développement des puces présentées en amont ont été élaborés dans ce but. Shin *et al.* ont conçu un modèle d’angiogenèse sur puce afin d’étudier l’effet de deux facteurs de croissances uniques (VEGF et ANG-1) sur l’élongation des cellules endothéliales [66]. Chung *et al.* ont également observé l’influence de facteurs de croissance et de la co-culture avec différents types cellulaires sur l’invasion des cellules endothéliales dans un gel [67, 68]. Kutys *et al.* ont eux reproduit un modèle d’angiogenèse en cultivant des cellules sur la paroi d’un gel et ont évalué l’effet des forces hémodynamiques et interstitielles sur l’invasion des cellules endothéliales dans le gel [69]. La puce de Kim *et al.* a d’ailleurs été modifiée afin d’analyser l’influence du flux interstitiel sur l’angiogenèse [70]. Son équipe a ainsi observé une amélioration de la réorganisation vasculogénique sous présence de flux interstitiel, et ont révélé que la formation des nouveaux vaisseaux se produisait dans la direction opposée du flux interstitiel. L’effet des forces de cisaillement sur la promotion de l’angiogenèse a été analysé sur le dispositif de Song et Munn [71]. L’influence de paramètres sur la perméabilité peut aussi être reproduit dans ces modèles, comme le montre le système de Lee *et al.* [72] et de Ahn *et al.* [73].

De nombreux systèmes reproduisent donc un réseau microvasculaire en développant des

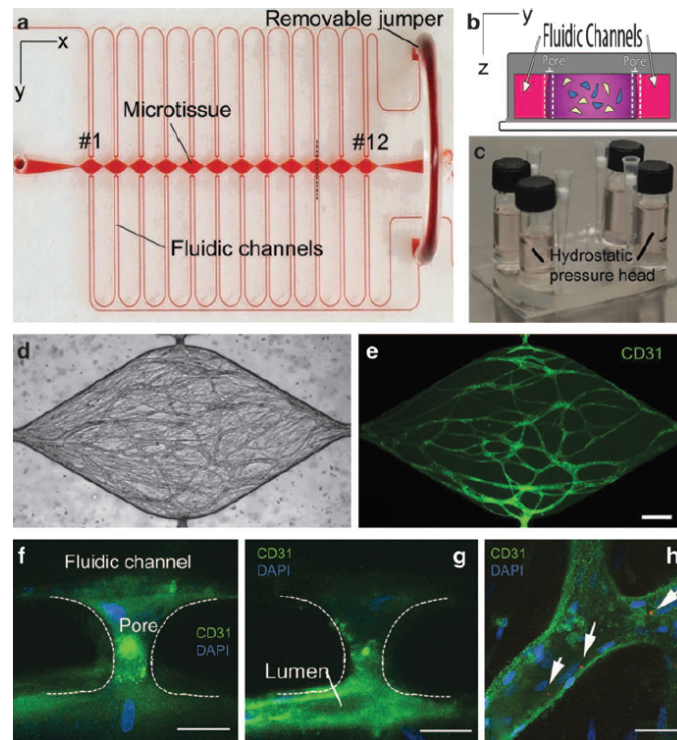


FIGURE 1.10 – Réseau microvasculaire développé par auto-assemblage de cellules endothéliales. [61]

(a) Vue du dessus de la puce. (b) Schéma de la chambre microfluidique remplie d'un gel de fibrine contenant des cellules endothéliales ECFC-ECs (Endothelial Colony Forming Cell-derived Endothelial Cells) et des fibroblastes (Normal Human Lung Fibroblasts). (c) Photographie de la puce microfluidique et de ses réservoirs de perfusion (d) & (e) Image en lumière blanche et fluorescente du réseau microvasculaire formé dans la chambre au bout de 14-21 jours (barre d'échelle = 200 μm). (f) & (g) Anastomose au niveau du canal d'entrée de la chambre (barre d'échelle = 50 μm). (h) Perfusion de microbilles fluorescentes de 1 μm dans les capillaires (barre d'échelle = 50 μm).

modèles d’angiogenèse ou de vasculogenèse. L’entreprise Mimetas commercialise notamment un dispositif microfluidique Organoplate⁶ afin de concevoir un réseau microvasculaire [74]. Ces systèmes sont plutôt utilisés pour étudier les différences de formation des réseaux selon les signaux appliqués. Les limites principales de cette approche sont le temps de développement du réseau, nécessitant généralement au minimum une semaine, et l’impossibilité de contrôler précisément la morphologie des vaisseaux. De plus, il n’a pas encore été montré que ces modèles reproduisaient la complexité d’un microenvironnement vasculaire, du niveau de celui observé dans un tissu sain ou cancéreux [46]. Cependant, comme cette stratégie repose sur l’auto-assemblage des cellules endothéliales et la reproduction des phénomènes d’angiogenèse et de vasculogenèse, elle a le potentiel de générer des réseaux microvasculaires spécifiques aux tissus perfusés. A notre connaissance, cette stratégie n’a pas non plus été appliquée au développement de modèles tissulaires épais. La seule stratégie émergente d’inclusion d’un réseau microvasculaire perfusant une construction tissulaire par angiogenèse ou vasculogenèse consiste à développer le réseau vasculaire dans une chambre centrale présentant une ouverture, et déposer une sphéroïde tissulaire sur le dessus de la chambre de culture. Cela permet d’alimenter la sphéroïde avec du milieu de culture, par le dessus de la chambre, pendant que le réseau vasculaire se forme et perfuse la sphéroïde, puis d’approvisionner la sphéroïde dans un second temps via le réseau vasculaire développé. C’est ainsi que procèdent Nashimoto *et al.* afin de perfuser une sphéroïde de poumon [75, 76]. La sphéroïde peut également être placée dans un second temps une fois la formation du réseau bien avancée.

1.3.2 L’endothélisation de surfaces

Cette technique utilise les propriétés d’adhérence des cellules endothéliales et leur capacité à se développer sur une surface en formant des jonctions serrées. Des structures sont construites au sein de canaux microfluidiques et des cellules endothéliales sont cultivées sur ces structures. En se développant, les cellules vont recouvrir toute la surface de la structure en formant des jonctions étroites, mimant ainsi l’endothélium. Différents modèles d’endothélium ont été développés en utilisant cette stratégie.

1.3.2.1 Développement d’un endothélium sur un substrat plan

Cette approche consiste à cultiver des cellules endothéliales sur un substrat plan afin de former une couche homogène de cellules endothéliales mimant un endothélium. Une seule couche d’endothélium est reproduite, c’est pourquoi cette technique est aussi parfois appelée recouvrement de parois 2D. Deux stratégies sont utilisées, dépendant de l’application.

Culture sur substrat plan

La première stratégie consiste à développer l’endothélium sur un substrat imperméable au liquide et transparent, comme le verre, le PDMS ou le plastique, pour permettre l’obser-

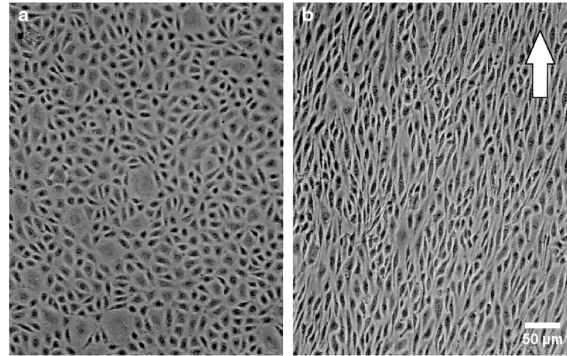


FIGURE 1.11 – Microscopie de phase de l’alignement des cellules endothéliales sous l’application d’un flux. [77]

(a) Monocouche cultivée dans des conditions statiques. (b) Monocouche soumise 24h à un flux dans la direction de la flèche imposant une force de cisaillement de 10 dynes/cm².

vation. Cette technique est similaire aux cultures planes classiques effectuées en flasques, hormis le fait qu’elle est développée dans une puce microfluidique. Elle est utilisée pour étudier la morphologie ou les sécrétions des cellules endothéliales seules en réponse à un stimulus spécifique. Ces stimuli sont implémentés dans la puce microfluidique, et la variation de phénotype des cellules est étudiée. Une co-culture avec un second type cellulaire peut également être réalisée en cultivant les deux types cellulaires côte-à-côte, ou une couche de cellule sur l’autre.

Différents signaux peuvent être appliqués. Le signal essentiel auquel les cellules endothéliales sont soumises, et facilement contrôlable en microfluidique, est l’application d’un flux. Les cellules endothéliales sont sensibles au flux et aux forces qu’il impose [77]. Les premiers tests d’analyse de l’influence du flux et du cisaillement étaient réalisées en cultivant ces cellules sur un viscosimètre modifié cône-plan afin d’imposer une force contrôlée. Dewey *et al.* [78] ont ainsi pu démontrer que des cellules endothéliales d’aorte bovine (BAEC) proliféraient à une vitesse similaire aux cultures statiques lorsqu’elles étaient soumises à un flux de 1 à 5 dynes/cm² et qu’elles adoptaient une forme allongée et s’orientaient dans le sens du flux sous un cisaillement laminaire de 5 à 10 dynes/cm² (Figure 1.11). Des résultats similaires ont été observés par l’équipe de Davies [79]. L’application d’un flux est facilement implémentable au sein d’une carte microfluidique. Les systèmes microfluidiques permettent d’atteindre de fort niveau de cisaillement et de contrôler précisément ces forces induites au niveau des parois du canal. Ils permettent également de reproduire des flux pulsés, grâce à l’utilisation de pompes péristaltiques. Des cellules endothéliales sont ainsi cultivées sur les parois d’un canal microfluidique, et un cisaillement spécifique est imposé aux cellules [80, 81, 80] afin d’observer les modifications morphologiques de l’endothélium et ses sécrétions (Figure 1.11). Malek et Izumo expliquent ces modifications en présentant les mécanismes d’arrangement du cytosquelette en réponse au cisaillement [82].

L’intérêt de tels systèmes est illustré par la publication de De Stefano *et al.* [83]. Avec son équipe, ils ont développé des canaux microfluidiques rectangulaires au sein d’une puce

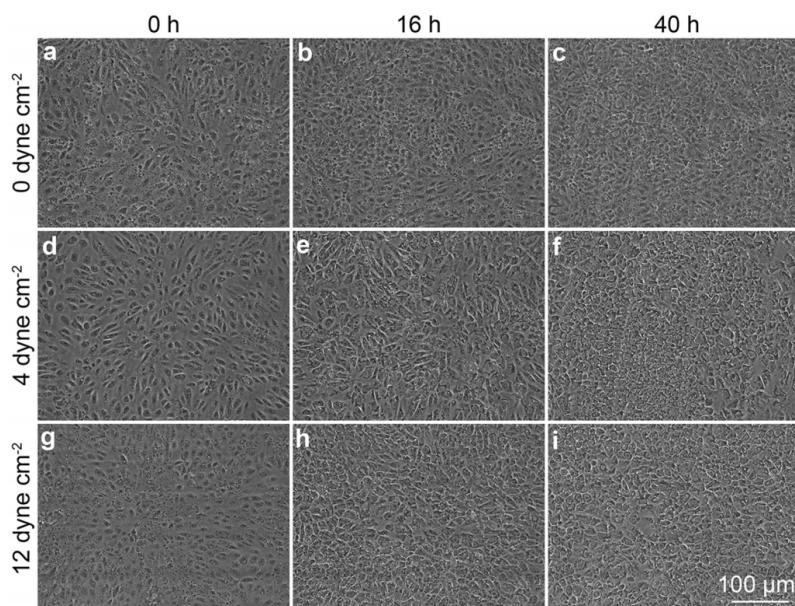


FIGURE 1.12 – Microscopie à contraste de phase de différentes monocouches de cellules dhBMECs soumises à un cisaillement au cours du temps. [83]
(a-c) Cisaillement nul. (d-f) Cisaillement de 4 dynes/cm². (g-i) Cisaillement de 12 dynes/cm².

microfluidique en PDMS afin d’étudier l’influence des forces de cisaillement sur un modèle d’endothélium de cerveau. Ces canaux sont refermés avec une lamelle de verre. Un mélange de fibronectine et de collagène UV a été déposé sur les parois des canaux afin de permettre l’adhésion des cellules endothéliales aux parois. Des cellules endothéliales microvasculaires de cerveau humain (dhBMECs) différenciées de cellules souches pluripotentes (hiPSC) sont ensuiteensemencées et cultivées sur la paroi inférieure du canal. Une fois une couche confluente de cellules endothéliales obtenue, un flux microfluidique est imposé. Ce modèle d’endothélium relativement simple a permis de révéler la différence de phénotype des cellules endothéliales du cerveau avec les cellules endothéliales des autres tissus. Sous un flux physiologique de 4 et 12 dynes/cm², ces cellules n’ont montré ni alignement, ni élongation dans le sens du flux (Figure 1.12). Le flux a pour effet d’augmenter les contacts entre les cellules rendant la barrière endothéliale du cerveau plus robuste.

Les exemples précédents cultivent des cellules endothéliales sur une surface plane ”inerte” (plastique, verre, silicium) d’un canal microfluidique creux, mais il est également possible d’implémenter les signaux paracrines en développant une couche de cellules endothéliales sur la surface d’un biopolymère incluant des cellules du tissu d’intérêt. Par exemple, Virumbrales-Muñoz *et al.* ont conçu une puce microfluidique permettant de cultiver des cellules cancéreuses au sein d’un hydrogel contenu dans un compartiment adjacent à un canal de perfusion [84]. Une couche de cellules endothéliales est cultivée sur l’interface plane entre le canal de perfusion et l’hydrogel. Leur système a permis d’étudier les interactions entre les cellules cancéreuses mammaires et les cellules endothéliales. La puce

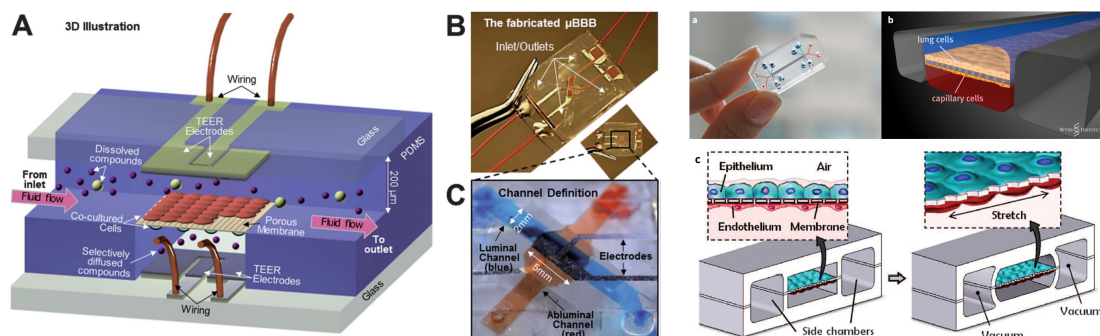
microfluidique OrganoPlate[®] 2 voies commercialisée par Mimetas permet également le développement d'un endothélium sur une interface de gel plan au sein d'un canal microfluidique.

Culture sur membrane semi-perméable

La seconde stratégie de développement d'un endothélium plan repose sur la culture des cellules endothéliales sur une membrane poreuse. Par rapport aux systèmes présentés précédemment, l'utilisation d'une membrane permet la culture de deux couches de cellules : une sur chaque face de la membrane. Des interfaces peuvent donc être reproduites avec ces dispositifs. Ils sont généralement utilisés pour étudier l'influence de molécules ou des interactions entre deux types de cellules sur la migration et l'invasion cellulaire [85]. Les chambres Boyden et Transwell[®] intègrent notamment une membrane poreuse séparant deux chambres. Leur utilisation a permis de mettre en avant une augmentation de la migration des cellules endothéliales en réponse à des facteurs de croissance endothéliaux [86]. Ils ont aussi permis de montrer l'impact de l'endothélium sur l'inhibition de la migration des cellules de muscles lisses [87]. Concernant la recherche sur le cancer, cette technique a révélé une augmentation de la production et la délivrance d'exosomes aux cellules cancéreuses par les fibroblastes associés au cancer, provoquant une augmentation de la prolifération tumorale [88]. Elle a également permis d'étudier les migrations des cellules cancéreuses au travers l'endothélium [89, 90, 91]. En revanche, un des désavantages de ces systèmes est le caractère statique des cultures.

De nombreuses techniques de fabrication de membranes semi-perméables sont disponibles de nos jours et ont permis leur inclusion au sein de cartes microfluidiques [92]. Le caractère dynamique, apporté par les systèmes microfluidiques, a ainsi pu être intégré aux cultures cellulaires et montrer les nombreuses différences physiologiques des cellules endothéliales soumises à un flux vis-à-vis des cultures statiques [93]. Par exemple, la puce microfluidique MOTiF manufacturée par l'équipe de Raasch du Jena University Hospital et conçue par l'entreprise ChipShop GmbH intègre une membrane en PET (Polyéthylène-téréphtalate) de 11 μm d'épaisseur contenant 2.105 pores/ cm^2 de 8 μm de diamètre [94]. En appliquant un cisaillement aux cellules endothéliales cultivées sur la membrane semi-perméable, cette équipe a corrélé une augmentation de la sécrétion de protéines régulatrices de la perméabilité de l'endothélium avec une augmentation de la force de cisaillement, par rapport aux cultures statiques.

L'intérêt de la membrane poreuse vis-à-vis du substrat imperméable est la possibilité d'étudier la perméabilité de la couche formée : en perfusant des composés de différentes tailles dans le canal supérieur, le fluide en sortie du canal inférieur peut être récupéré et analysé. Ainsi, en injectant des molécules de différentes tailles, il est possible, en déterminant la plus grande molécule ayant traversé l'interface, de déduire la porosité de la couche d'endothélium formée. Par exemple, Thomas *et al.* ont utilisé cette technique afin d'étudier la perméabilité de l'endothélium soumise à un stress inflammatoire [95]. Un modèle similaire a également été développé par Sato et son équipe [96] : ils ont reformé un endo-



(a) Barrière sang/cerveau sur puce. [97]

(A) Deux canaux microfluidiques perpendiculaires sont séparés par une membrane poreuse. (B) Photographie de la puce microfluidique. (C) Vue proche de l’unité neurovasculaire. Les cellules endothéliales sont cultivées du côté perfusable et les astrocytes du côté fermé de la membrane poreuse.

(b) Poumon-sur-puce développé par le Wyss Institute. [101]

(a) Photographie de la puce. (b) Représentation d’une section de la puce microfluidique. (c) Schéma du mécanisme de contraction/étirement de la membrane poreuse.

FIGURE 1.13 – Organes-sur-puces reproduisant un endothélium plan perméable

thélium sanguin sur une des faces de la membrane et un endothélium lymphatique sur la face opposée, et ont étudié les différences de perméabilité selon différents types de cellules co-cultivées. Ils ont également évalué les changements de perméabilité de l’endothélium lors de l’injection de venin de serpent provoquant une réaction inflammatoire. D’autres interfaces de tissus ont été développées avec cette stratégie. Par exemple, la culture de cellules endothéliales et de cellules de cerveau permet de reproduire des modèles de la barrière sang-cerveau [97, 98, 99] (Figure 1.13a). De la même manière, la culture de cellules endothéliales et d’hépatocytes a permis la conception de modèle de foie-sur-puce [100].

Ces modèles sont ainsi utilisés pour reformer des interfaces comportant un endothélium et reproduire les interactions entre cellules vasculaires et parenchymateuses. L’exemple le plus connu est certainement le modèle de poumon-sur-puce microfluidique développé par le Wyss Institute [101] : des cellules endothéliales et des cellules épithéliales alvéolaires sont cultivées de part et d’autre d’une membrane de PDMS recouverte de matrice extracellulaire séparant deux canaux microfluidiques. Le canal côté endothélium est perfusé avec du milieu de culture et de l’air circule du côté épithélium (Figure 1.13b). La membrane semi-perméable de culture est reliée à des canaux latéraux dans lesquels l’application d’un vide permet l’étirement de la membrane. Ces mouvements d’étirements/relâchements de la membrane endothéliale/épithéliale permettent de mimer la contraction des alvéoles pulmonaires durant la respiration. Cette configuration permet de mimer l’interface sang/poumon des alvéoles pulmonaires. Ce modèle de poumon-sur-puce a entre autre été utilisé afin d’étudier la diffusion d’aérosols au travers de cette interface mimant l’environnement poumon-sang des alvéoles pulmonaires.

La combinaison d’une membrane semi-perméable en combinaison avec la culture de

cellules n'est pas la seule technique utilisée pour reproduire un endothélium. Par exemple, Gori *et al.* ont mimé un endothélium de foie sans utilisation de cellules endothéliales : ils ont cultivé des cellules hépatiques dans une chambre reliée à un canal de perfusion par des microcanaux rectangulaires de $2\ \mu\text{m}$ de largeur afin de mimer la perméabilité de l'endothélium [102]. Ce dispositif leur a permis l'étude de maladies hépatiques. Cette stratégie avait également été utilisée par Lee et son équipe [103].

Ces modèles simples sont utiles pour étudier la réponse d'un phénotype cellulaire à un stimulus mécanique ou biochimique. Walter *et al.* comparent différents systèmes utilisant une membrane semi-perméable afin de reproduire une interface dans leur publication [104]. Cependant, de nombreuses limites résident dans ces puces qui ne permettent pas la reproduction d'un réseau microvasculaire complexe. Tout d'abord, l'utilisation d'une membrane empêche les contacts directs entre les deux couches de cellules, limitant les interactions entre les cellules endothéliales et les cellules parenchymateuses. De plus, la rigidité de la membrane est trop importante pour reproduire l'interaction entre les cellules et la matrice extracellulaire [105]. Bien qu'ils puissent être complexes, ces dispositifs restent des modèles de culture 2D, or la tridimensionnalité possède une grande influence sur le phénotype cellulaire.

1.3.2.2 Développement d'un endothélium sur la surface interne de canaux creux

Cette technique repose sur l'inclusion de canaux creux au sein d'hydrogels et l'attache de cellules endothéliales sur les parois afin de reformer un endothélium et mimer la structure d'un capillaire sanguin. Contrairement à la technique précédente, les cellules ne sont pas cultivées sur une seule face du canal de perfusion mais recouvrent la totalité du canal, formant un tube creux. L'intérêt du développement d'un endothélium enveloppant une structure creuse a été mis en avant par l'équipe de Bischel *et al.* [106]. Son équipe a examiné le phénotype d'endothéliums développés *in vitro* sous différentes formes, et a comparé les sécrétions de facteurs de croissance et de cytokines. Leur étude a révélé une physiologie *in vivo* plus proche dans le cas d'un endothélium formant un tube cylindrique.

Les techniques disponibles permettent la conception d'un canal, ou d'un réseau de canaux, au sein d'un volume d'hydrogel ou de biopolymère reproduisant la matrice extracellulaire des tissus. Ces biopolymères peuvent ainsi contenir des cellules afin de reproduire un environnement tissulaire perfusé. Des précautions doivent cependant être prises dans le choix du biopolymère. Les cellules endothéliales nécessitent notamment un substrat suffisamment rigide pour se développer et former un endothélium homogène. Cette rigidité permet également aux cellules de résister aux forces de cisaillement et de déformations élastiques exercées par le fluide sur le canal de perfusion. De plus, les cellules endothéliales ont tendance à envahir la matrice extracellulaire sur laquelle elles reposent lorsque celle-ci est trop souple [107].

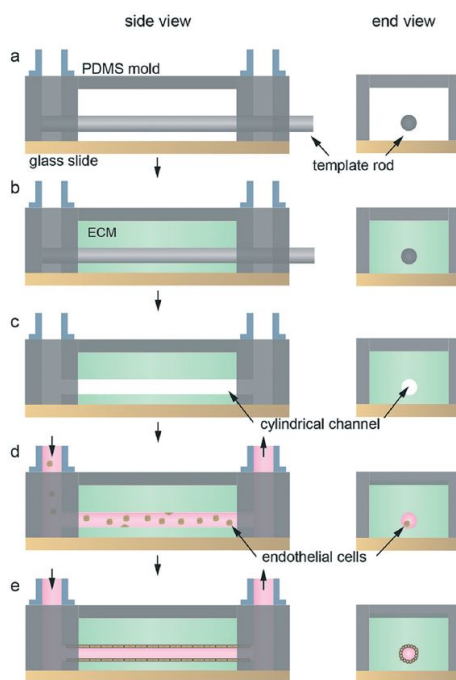


FIGURE 1.14 – Fabrication de microvaisseaux à partir d’un motif cylindrique. [50]
 (a) Une aiguille ou une tige est insérée dans un moule (généralement en PDMS). (b) Le moule est rempli d’hydrogel ou biopolymère mimant la matrice extracellulaire. (c) Après polymérisation, l’aiguille ou la tige est retirée laissant un espace vide de forme cylindrique. (d) Des cellules endothéliales sont déposées dans l’espace vide afin de recouvrir les parois. (e) Les cellules adhèrent aux parois et se développent recouvrant la totalité de la surface.

Utilisation de tiges solides comme motifs cylindriques

Une stratégie de construction d’un tube cylindrique creux consiste à utiliser une forme cylindrique comme une aiguille ou une tige en tant que motif du futur canal (Figure 1.14). La forme cylindrique est placée dans un moule, puis le moule est rempli d’un hydrogel liquide enveloppant la structure solide. L’hydrogel est ensuite solidifié et le gabarit est retiré laissant un espace vide au sein de l’hydrogel. Cet espace vide peut alors être connecté à un système microfluidique. Des cellules endothéliales sont injectées dans le canal formé afin de permettre leur adhésion sur les parois du canal. Elles se développent ensuite et recouvrent les parois d’hydrogels. Une fois l’endothélium formé, le système peut être perfusé par du milieu de culture. Des cellules peuvent être incluses dans le biopolymère avant le remplissage du moule [108]. D’autres cellules peuvent également être adhérentes sur les parois creuses avant recouvrement par les cellules endothéliales afin de reproduire des couches de cellules structurées [109]. Ainsi, un microenvironnement constitué d’une matrice extracellulaire contenant des cellules d’intérêts et perfusé d’un vaisseau sanguin peut être reproduit.

Le collagène est majoritairement utilisé en tant que biopolymère enveloppant le canal, de par sa forte présence dans la matrice extracellulaire des tissus *in vivo*, à des concen-

trations généralement supérieures à 6 mg/mL pour obtenir une rigidité suffisante. De la fibrine est parfois utilisée en association avec le collagène [110, 111, 112]. Par exemple, l'équipe de Chrobak *et al.* a développé un canal creux recouvert d'une couche de cellules endothéliales confluentes au sein d'un gel de collagène et de fibrine par utilisation d'une micro-aiguille [113]. Ce dispositif a permis l'étude de la perméabilité de l'endothélium et les interactions des cellules endothéliales avec différents types cellulaires inclus dans l'hydrogel comme les leucocytes ou péricytes, entre autres. L'équipe de Sadr *et al.* ont combiné l'utilisation d'une tige, afin de servir de motif, et des techniques de fonctionnalisation de surface afin de former un canal creux à section circulaire recouvert de fibroblastes sur lesquels repose une couche de cellules endothéliales [114]. Dans ce cas précis, la tige est retirée du gel par application d'une stimulation électrique.

Cette technique permet le développement rapide d'un vaisseau cylindrique couvert d'un endothélium. Plusieurs systèmes l'ont utilisée [115, 116, 117]. Les cellules endothéliales déposées dans de tels canaux présentent des jonctions serrées, forment une barrière endothéliale importante et résistent à l'adhésion des globules blancs. Un modèle de la barrière hémato-encéphalique, conçu à partir de cette technique, a même été commercialisé par Flocel. Il consiste en un tube micro-poreux recouvert de cellules endothéliales et parcouru par un flux. Ce tube est immergé dans une chambre contenant des cellules gliales et des astrocytes cultivées avec des facteurs de croissance, permettant les interactions entre les cellules neuronales et endothéliales [118]. Cependant, bien que l'équipe de Wont *et al.* ait pu réaliser un réseau de canaux en utilisant des aiguilles en tant que motif [119], l'utilisation de cette stratégie limite le développement de géométries complexes. De plus, les vaisseaux conçus par cette technique possèdent des diamètres de 100 μm à 200 μm qui ne correspondent pas aux dimensions physiologiques des capillaires sanguins [120].

Conception d'un réseau vasculaire par bioimpression d'encre sacrificielle

L'utilisation d'un outil cylindrique afin de construire des canaux au sein d'un hydrogel présente ses limites. D'autres méthodes sont disponibles afin de développer un réseau de canaux creux, destinés à être tapissés de cellules endothéliales, au sein d'un hydrogel. L'utilisation d'une encre sacrificielle conserve l'idée de la technique précédente : un modèle représentant le motif des futurs canaux est conçu à partir d'un hydrogel ou un biopolymère dont la gélification est réversible. Ce matériau est inclus au sein d'un hydrogel réticulé représentatif de la matrice extracellulaire. Le matériau est alors dégélifié laissant des espaces vides, disponibles au peuplement des cellules endothéliales et à la perfusion. Un développement d'un réseau endothélialisé est alors développé selon la topologie définie par l'encre sacrificielle.

Par exemple, Miller *et al.*, ont recréé un tissu vascularisé en utilisant cette approche [121]. Un réseau de filaments interconnectés a été fabriqué par bio-impression d'un polymère à base de sucre et englobé au sein d'une matrice extracellulaire contenant des cellules. Le réseau bioimprimé a ensuite été dissout dans du milieu sans causer de dommages aux cellules avoisinantes (Figure 1.15A & 1.15B). Des cellules endothéliales sont injectées dans le réseau creux afin de recouvrir les parois. D'autres cellules endothéliales sont également

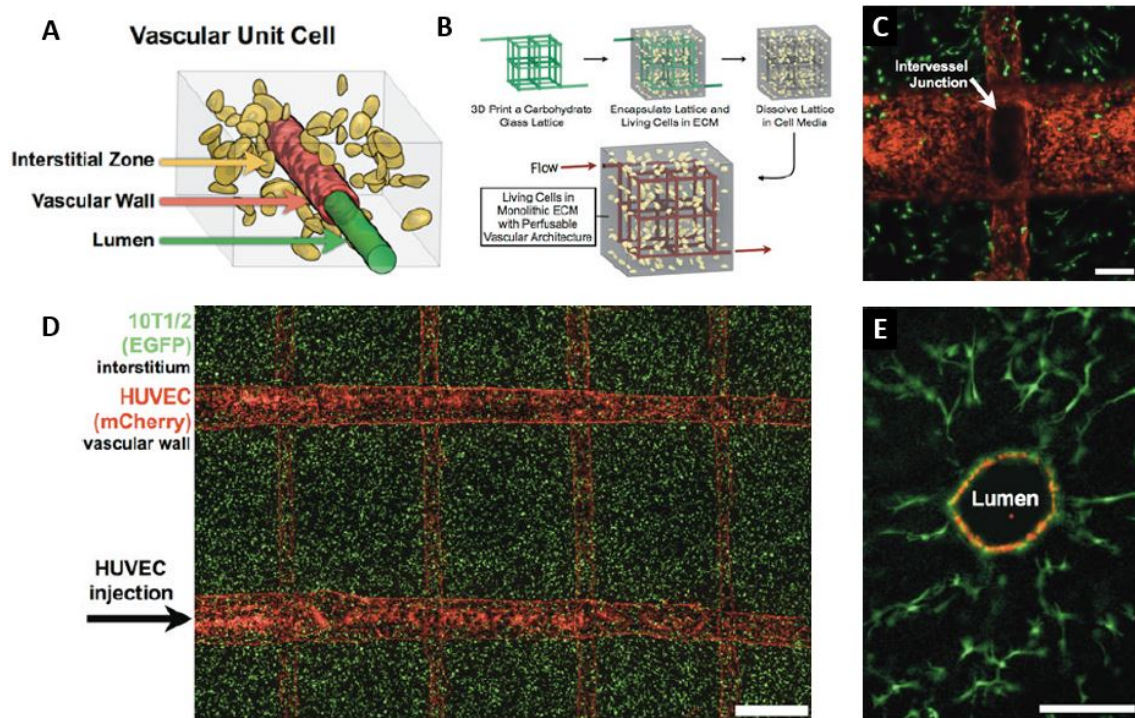


FIGURE 1.15 – Conception d’un réseau vasculaire par impression d’une encre sacrificielle. [121]

(A) Schéma de l’environnement vasculaire développé. (B) Principe de la technique d’utilisation de l’encre sacrificielle. (C) Image fluorescente d’une intersection de vaisseaux montrant une endothélialisation des parois enveloppant un tube creux (barre d’échelle = 250 μm). (D) Image fluorescente du réseau développé (barre d’échelle = 1 mm). (E) Section transverse après 9 jours de culture montrant une couche de cellules endothéliales enveloppant le lumen et entourée de cellules 10T1/2 (barre d’échelle = 200 μm).

encapsulées ou incorporées dans le gel de matrice extracellulaire en complément. Ils ont ainsi pu construire une construction tissulaire de 1 mm d’épaisseur perfusable (Figure 1.15D & 1.15E). Au lieu d’imprimer le réseau puis de remplir l’espace vide autour de l’impression par de l’hydrogel, il est possible d’imprimer le réseau d’encre sacrificiel directement au sein d’un bloc d’hydrogel non gélifié, comme ont pu le faire Wu et son équipe [122].

Cette technique a également été développée par Kolesky *et al.* (Figure 1.16) [123]. Son équipe a conçu un réseau de tubes en utilisant du Pluronic F127 en tant qu’encre sacrificielle. Ce polymère est évacué par refroidissement à 4°C, provoquant sa liquéfaction. Ce réseau a pu être inclus au sein d’une matrice composée de gélatine et de fibrinogène et combiné avec un système de perfusion microfluidique : ce système a pu être appliqué à un modèle d’os. Des cellules souches mésenchymateuses (hMSCs) ont été incluses dans la matrice perfusée et l’utilisation de facteurs de croissance a permis la différenciation en une lignée ostéogénique. Leur construction a été perfusée durant plus d’un mois et

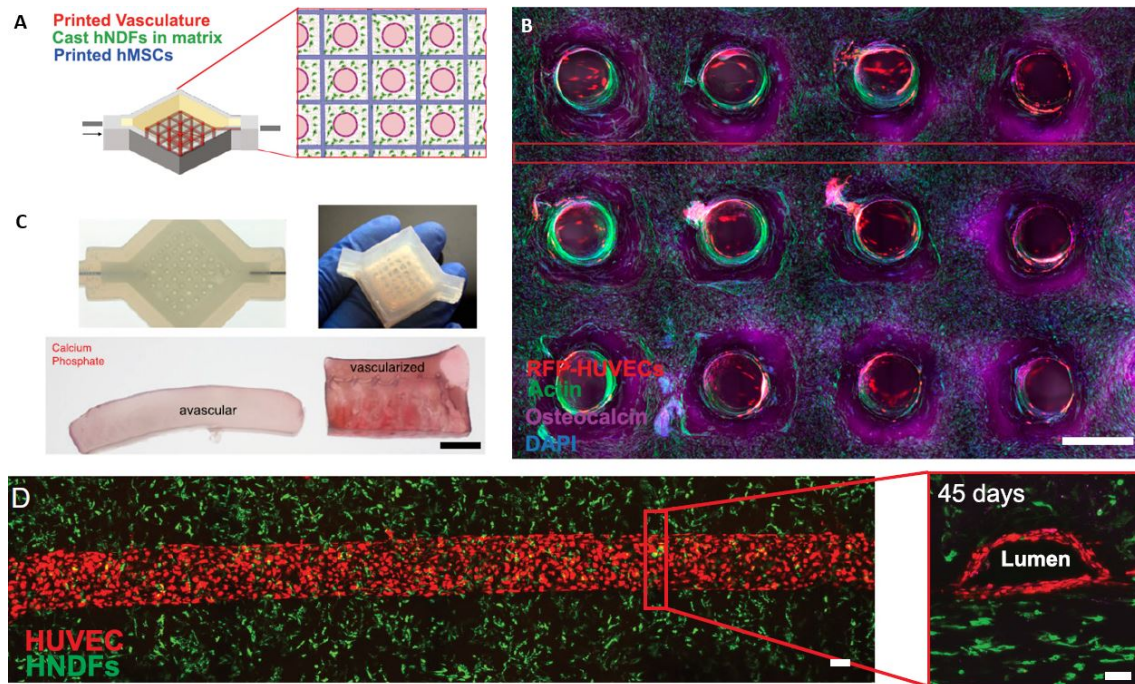


FIGURE 1.16 – Conception d'un réseau vasculaire perfusant une construction tissulaire. [123]

(A) Schéma de la structure tissulaire bioimprimée. (B) Microscopie d'une section transverse de 1 cm d'épaisseur de la construction tissulaire ostéogénique développée après 30 jours de perfusion active (barre d'échelle = 1,5 mm). (C) Photographie de la construction développée en puce et démoulée et comparaison d'une section d'un tissu non vascularisé (coin inférieur gauche) avec un tissu vascularisé (coin inférieur droit) après 30 jours de perfusion de milieu ostéogénique (barre d'échelle = 5 mm). (D) Conception d'un canal seul recouvert de cellules endothéliales et entouré de fibroblastes montrant un lumen après 45 jours de perfusion (barre d'échelle = 100 μm).

demi. L'équipe de Miller a également prouvé la possibilité d'utilisation de ces réseaux de tubes creux *in vivo*. En concevant un réseau de canaux au sein d'un gel de PDMS par bio-impression de leur encre sacrificiel, Sooppan *et al.* ont révélé une anastomose de leur système avec l'artère fémorale du rat greffé [124]. Dans ce cas précis, des cellules endothéliales n'ont pas été utilisées pour recouvrir les parois et seule la structure creuse a été utilisée.

L'utilisation d'une encre sacrificielle afin de construire un réseau de tubes creux est une approche ayant été développée par plusieurs laboratoires [125, 126, 127]. Cependant, plusieurs désavantages résident dans l'utilisation d'une encre sacrificielle. Le principal désavantage est la difficulté à concevoir des vaisseaux de dimension inférieure à 150 μm . La physiologie des capillaires possédant un diamètre inférieur à la trentaine de microns ne peut ainsi être reproduite. Le second désavantage est lié au premier : l'efficacité de l'évacuation et du rinçage de l'encre sacrificiel diminue fortement avec la dimension des vaisseaux.

Les réseaux sacrificiels présentés dans les exemples présentés sont majoritairement conçus par bio-impression en utilisant la technique d’extrusion, technique limitée en résolution. Cependant, l’utilisation d’autres méthodes d’impression peut permettre d’atteindre une dimension de canal plus faible.

Conception de canaux creux par stéréolithographie

Les techniques présentées reposent sur la gélification d’une matrice extracellulaire autour d’une structure amovible représentative du réseau microvasculaire. Cependant, les techniques de développement de structure artificielle manquent de résolution. La lithographie est une technique de conception de réseau sacrificiel à la résolution augmentée. Elle permet la conception d’un réseau artificiel par photopolymérisation d’une encre. L’utilisation de laser et de la technique de bi-photon permet d’atteindre des résolutions de construction précises. Un réseau sacrificiel est ainsi conçu au sein d’un gel sacrificiel. Le réseau est polymérisé et le gel non polymérisé est évacué. Un hydrogel représentatif de la matrice extracellulaire est ensuite coulé dans le moule contenant le réseau sacrificiel et vient épouser les formes du réseau. Une fois l’hydrogel réticulé, le réseau sacrificiel est dissout et évacué, laissant un réseau de tube creux.

Par exemple, Kang *et al.* conçoivent un réseau sacrificiel par stéréo-lithographie [128], avec une résolution de 50 à 70 μm . L’équipe de Golden et Tien forme des vaisseaux de 50 μm par déposition de gélatine aux extrémités d’un gel de collagène au sein d’un moule en PDMS [108]. Cependant, les techniques lithographiques classiques forment des canaux à section rectangulaire. Néanmoins, il a été observé que des cellules endothéliales recouvrant des canaux rectangulaires adoptent une forme courbée au niveau des coins perpendiculaires formant ainsi une section cylindrique [129]. Zheng *et al.* ont utilisé la lithographie pour développer des canaux creux à section carré d’approximativement 100 μm de largeur au sein d’un gel de collagène contenant des cellules de la périphérie vasculaire (Figure 1.17). Les canaux sont par la suite recouverts de cellules endothéliales et démontrent des propriétés physiologiques des vaisseaux sanguins telles que la perméabilité, la non-thrombogénicité et la réponse inflammatoire.

L’équipe de Bischel *et al.* a également développé une technique de formation d’endothélium à section circulaire au sein de canaux rectangulaires [130]. Pour cela, ils utilisent les propriétés d’instabilité de Saffman-Taylor en injectant un polymère visqueux non réticulé dans les canaux rectangulaires, et perfusent ensuite du milieu de densité plus faible. Les propriétés de viscosité vont permettre l’évacuation du polymère en gardant une couche au niveau des parois et des coins du canal. Ce polymère restant est alors réticulé et des cellules endothéliales sont déposées sur les parois, comme pour les techniques précédentes.

La technique de recouvrement de parois repose sur la conception de canaux creux. Cependant, il est difficile de construire des canaux de diamètres inférieurs à 100 μm avec ces techniques. Néanmoins, Arakawa *et al.* ont récemment créé des canaux creux à section rectangulaire atteignant une largeur de 10 μm au sein d’un biopolymère synthétique en utilisant la technique d’ablation laser [131]. Un laser bi-photon permet de dégrader localement

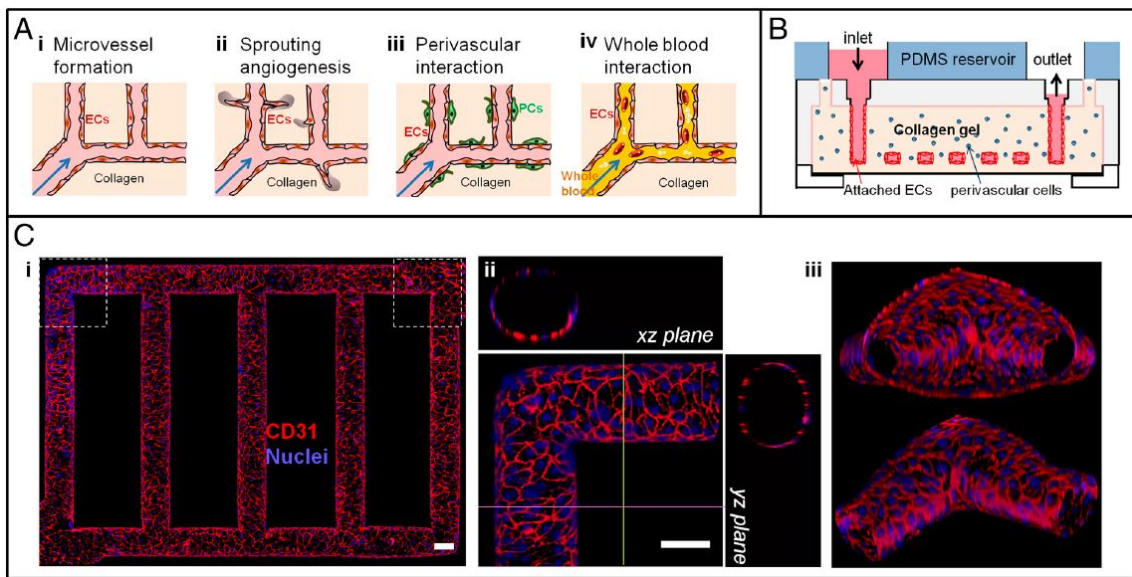


FIGURE 1.17 – Réseau de canaux creux vascularisés conçu par lithographie. [129]
 (A) Schéma d'une section de la construction et des propriétés vasculaires pouvant être étudiées par le système. (B) Schéma de la section du système. (C) i. Section horizontale des vaisseaux endothélialisés. ii. Projection d'images prises dans la direction z d'un coin de canal endothélialisé. iii. Projection d'images prises dans la direction z d'une bifurcation de canaux endothélialisés (barre d'échelle = 100 μm).

l’hydrogel et forme des canaux creux pouvant être ensuite endothélialisés. Néanmoins, la génération de canaux de dimension inférieure à $100\ \mu\text{m}$ présente généralement des risques d’effondrement des hydrogels. De plus, plus les canaux sont de faibles dimensions, plus il est compliqué de recouvrir de cellules endothéliales la totalité des parois avec une densité cellulaire suffisante et de manière homogène. Des bouchons de cellules peuvent également se former facilement lors de l’injection de cellules endothéliales destinées à recouvrir les parois dans ces canaux de faible dimension. En revanche, il est possible de concevoir des canaux creux de dimension large, et de promouvoir l’angiogenèse des parois des canaux vers l’hydrogel enveloppant les vaisseaux formant ainsi des vaisseaux plus fins de la dimension des capillaires [115, 132, 133]. Cette dernière stratégie combine ainsi la technique de recouvrement de parois avec celle d’auto-assemblage, et permet de créer des réseaux de capillaires perfusables et rattachés à un modèle de vaisseau sanguin large.

1.3.3 Fabrication additive

La technique précédente positionne des cellules endothéliales au sein de structures creuses. Pour former ces structures, un motif négatif sert généralement de guide pour la construction des futurs vaisseaux et est retiré du gel final. Comme l’on enlève la structure du gel, on peut considérer les techniques précédentes comme des techniques de fabrications soustractives. Cela oppose ces techniques à la fabrication additive qui désigne l’ensemble des procédés de fabrication par ajout de matière. On retrouve dans ces parties la bioimpression de composés biologiques et l’assemblage de modules.

1.3.3.1 La bioimpression

La bioimpression désigne une technique de structuration spatiale des composants d’un tissu biologique par déposition et assemblage couche-par-couche de biomatériaux contenant des cellules vivantes. Cette technique est assistée par ordinateur. Les biomatériaux imprimés sont des hydrogels et l’ensemble hydrogel et cellules est appelé une bio-encre. De nombreux biomatériaux naturels sont utilisés parmi l’alginate, la gélatine, la fibrine et le Matrigel. L’empilement de différentes couches rend possible la conception d’un assemblage précis en trois dimensions. Plusieurs techniques de bioimpression ont été développées : l’impression goutte-à-goutte (DoD pour Drop-on-Demand), la micro-extrusion et la bioimpression assistée par laser. Leurs principes sont schématisés Figure 1.18.

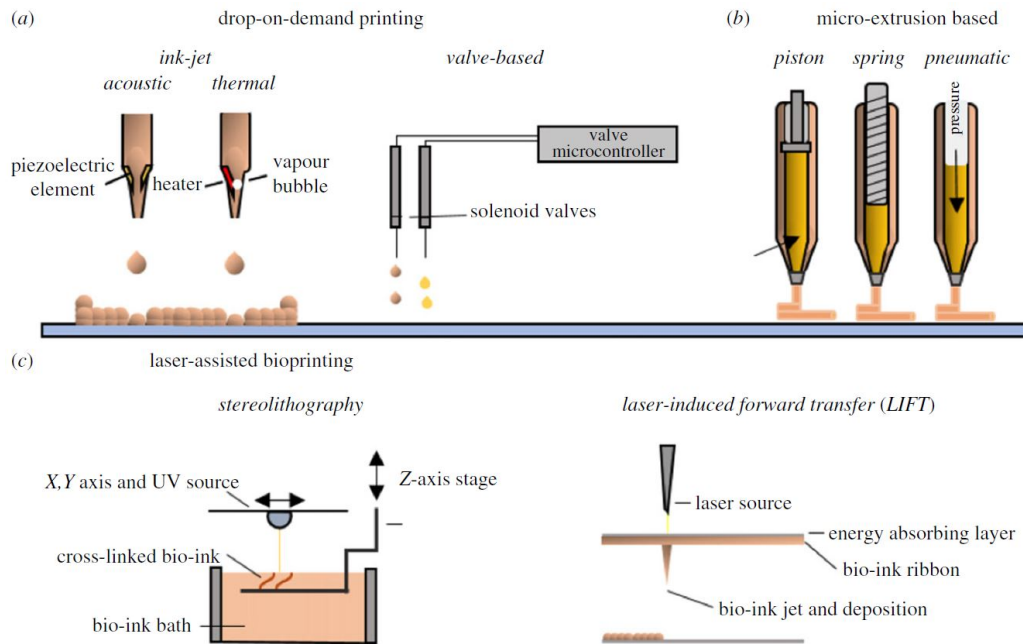


FIGURE 1.18 – Principales méthodes de bioimpression. [134]

(a) Impression goutte-à-goutte (DoD) comprenant l'impression par jet d'encre et et l'impression utilisant des valves. (b) Micro-extrusion et ses différentes techniques pour expulser le biopolymère. (c) Bioimpression assistée par laser : stéréolithographie et transfert de goutte assisté par laser (LIFT).

Bioimpression goutte-à-goutte

La technique d'impression goutte-à-goutte consiste en l'expulsion de gouttes d'hydrogels. L'encre est expulsée au travers d'un embout et des gouttes sont détachées par diverses méthodes : un activateur thermique ou piezo-électrique, ou un activateur pneumatique. Ce type d'impression rend possible la déposition de gouttes dont le volume atteint le picolitre. Ainsi, la résolution pouvant être atteinte est très élevée : il est possible d'imprimer des gouttes contenant une seule cellule [135] (Figure 1.19A). Cui *et al.* ont utilisé une technique de bioimpression par jet thermique d'encre pour former des canaux de fibrines contenant des cellules endothéliales [136] (Figure 1.19A & 1.19B). Leur construction a montré un alignement des cellules endothéliales dans les canaux et le développement d'une couche confluyente tapissant la structure tubulaire au bout de 21 jours. Christensen *et al.* ont quant à eux construit des structures tubulaires creuses par bioimpression par jet piezo-électrique d'une encre d'alginate contenant des fibroblastes [137]. Leur système permet le développement de tubes creux de 3 mm de diamètre avec une épaisseur de paroi de 1 mm. Les cellules encapsulées dans la paroi présentent une viabilité de plus de 90%. Yanez *et al.* ont utilisé une imprimante à jet d'encre pour bioimprimer un gel de fibrine contenant des cellules endothéliales entre deux couches de collagène [138]. La couche supérieure de collagène contient des kératinocytes et la couche inférieure des fibroblastes, mimant ainsi un modèle de peau. Leur construction a été greffée sur une souris et a prouvé une

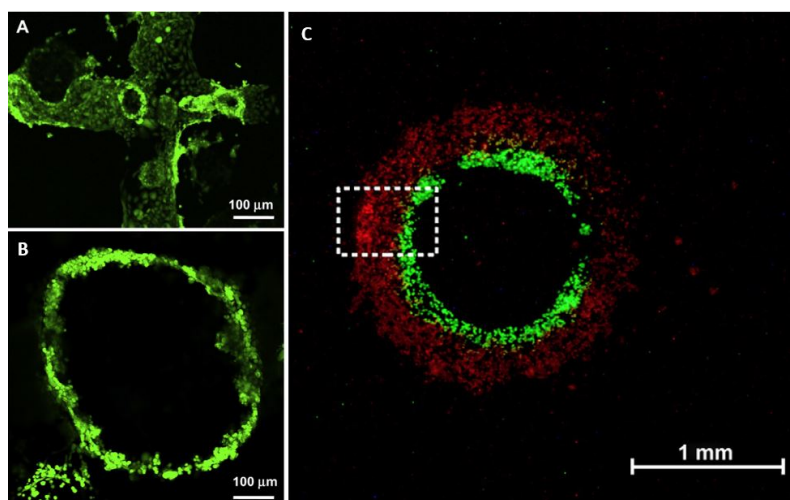


FIGURE 1.19 – Vaisseau sanguin bioimprimé. [135]

(A) Cellules endothéliales HMVECs (Human MicroVascular Endothelial Cells encapsulées dans un gel fibrine, bioimprimées pour former des canaux perpendiculaires et cultivées pendant 14 jours [136]. (B) Cellules endothéliales imprimées en forme d’anneau et cultivées pendant 21 jours [136]. (C) Bioimpression de deux couches de biopolymère contenant des cellules endothéliales en deux dimensions formant anneau creux de diamètre interne 1,2 mm.

amélioration de la cicatrisation de plaie par rapport aux souris non greffées. Ces études impriment souvent une seule couche de bioencres et ne permettent pas la construction d’un tissu vascularisé épais.

De nombreuses études utilisent l’alginate et ses dérivés en tant que bioencres pour, entre autres, ses propriétés de gélification rapide et ses propriétés mécaniques, et le calcium chlorure en tant qu’agent de réticulation, afin de développer un réseau vasculaire montrant une croissance des cellules en culture, autant *in vivo* qu’*in vitro* [139, 140, 141, 142, 143]. Par exemple, Xu *et al.* utilisent l’alginate afin de concevoir un échafaudage et d’inclure également du collagène. Dans cette étude, trois bioencres contenant des cellules de muscles lisses de chien, des cellules souches humaines dérivées du fluide amniotique et des cellules endothéliales d’aorte bovine sont imprimées pour former l’échafaudage. Cette construction vascularisée devient mature et développe un tissu fonctionnel une fois implantée *in vivo* [144].

La viabilité des cellules après impression reste la considération primordiale de toute construction tissulaire. Or, la bioimpression goutte-à-goutte nécessite l’utilisation d’embouts pour expulser les gouttes. Le diamètre des embouts détermine généralement la taille des gouttes expulsées. Ainsi, plus le diamètre est faible, plus la résolution de la bioimpression sera grande. Cependant, des bouchons se forment régulièrement, notamment pour les embouts de faibles diamètres, et compliquent la formation de tissus épais. De plus,

le procédé d'expulsion des gouttes génère une force de cisaillement sur les cellules contenues dans la bioencore, à laquelle peut s'ajouter un stress lié au procédé d'expulsion des gouttes (chauffage ou application d'un voltage). Cette force de cisaillement est d'autant plus importante que la viscosité du biopolymère est élevée. Cela empêche l'utilisation de polymère à viscosité élevée avec cette technique de bioimpression. La restriction à des biopolymères de faible viscosité empêche l'impression de forte densité cellulaire et génère des effondrements des structures imprimées en trois dimensions ce qui limite actuellement la réalisation de tissus épais avec cette technique [145].

Bioimpression par extrusion

La bioimpression par extrusion est la technique de bioimpression la plus facilement développable et, de ce fait, la plus développée en laboratoire [146]. Une pression est appliquée pour expulser uniformément l'hydrogel d'un embout d'aiguille. Ouyang *et al.* utilisent la bioimpression par extrusion pour former une construction épaisse à partir d'un mélange de gélatine et d'alginate contenant des cellules souches embryonnaires [147]. Leur construction est conçue par impression de tiges parallèles de biopolymères espacées de 1 mm formant une couche plane poreuse. Une seconde couche dont les tiges sont orientées perpendiculairement à la précédente est ensuite imprimée sur la première couche, et ainsi de suite. Cette stratégie permet la conception d'une grille 3D pouvant être perfusée par du milieu de culture et dont les parois peuvent être recouvertes de cellules endothéliales. Cette structure a également été reproduite par Khalil et Sun [148] à partir d'un gel d'alginate incluant des cellules endothéliales. Ils ont ainsi pu construire un environnement tissulaire de 10 mm^3 avec une vitesse de construction de $100 \mu\text{m/s}$. Une imprimante à extrusion est également utilisée par Kang *et al.* afin de concevoir des constructions tissulaires épaisses et poreuses afin de permettre la diffusion de nutriments aux cellules [34]. Norotte *et al.* ont utilisé l'impression de tiges afin de concevoir une sorte de moule pour la conception d'un vaisseau de diamètre interne allant de $900 \mu\text{m}$ à $2,5 \text{ mm}$ [149] (Figure 1.20A). En bioimprimant des tiges d'agarose et des sphéroïdes de manière pyramidale, leur technique permet la conception d'un tube homogène en 5 à 7 jours. Le plus petit vaisseau conçu par cette technique possède un diamètre de $900 \mu\text{m}$ et une épaisseur de parois de $300 \mu\text{m}$. Ils ont également adapté leur technique pour concevoir plusieurs parois concentriques : une paroi interne contenant des cellules de muscles lisses mimant la tunique médiane des vaisseaux et une paroi externe contenant des fibroblastes mimant la tunique externe (Figure 1.20A4). La tunique interne peut être reproduite par déposition de cellules endothéliales.

Les systèmes de bioimpression par extrusion peuvent être adaptés pour la bioimpression directe de tubes creux. Pour cela, plusieurs embouts coaxiaux sont utilisés afin de créer des parois enveloppant une structure tubulaire creuse [150, 151]. Par exemple, l'équipe de Zhang a utilisé plusieurs embouts afin de bioimprimer directement un tube creux (Figure 1.20C) : l'embout central de coeur est utilisé pour faire circuler un flux contenant des ions bivalents provoquant la gélification de l'alginate. L'alginate circule ainsi dans l'embout concentrique périphérique et gélifie quasi-instantanément par diffusion des ions bivalents

et permet la formation d’un tube creux [152]. Des fibroblastes sont ainsi encapsulés dans la couche périphérique formant la paroi du vaisseau. Des cellules endothéliales peuvent recouvrir les parois du canal formé et du milieu de culture ou du sang peuvent être perfusés. Des cellules endothéliales peuvent également être contenues dans une fine couche de la paroi afin d’augmenter la densité cellulaire. Des vaisseaux microfluidiques incluant des cellules de support ont été fabriqués par des tubes coaxiaux à des fins de vascularisation [153, 154].

La bioimpression par extrusion est la plus répandue et permet la construction d’un tissu ligne par ligne. En plaçant les cellules et le biomatériau à des localisations précises, cette technique permettrait un assemblage rapide de vaisseaux fonctionnels. De plus, à l’inverse de la technique de bioimpression goutte-à-goutte, cette technique permet la déposition de biopolymère visqueux. En revanche, l’utilisation de viscosité élevée engendre un cisaillement plus important pouvant être nocif pour les cellules. A l’opposé, l’impression d’hydrogels à viscosité faible entraîne généralement une perte de la structure avant la gélification du biopolymère. Enfin, la résolution de cette technique décroît généralement avec l’augmentation de la viscosité, et en fait la technologie de bioimpression à la résolution la plus faible, avec une précision de l’ordre de 30 à 100 μm pour les imprimantes les plus précises. Les vaisseaux développés par ce type de bioimpression n’atteignent cependant généralement pas un diamètre inférieur à 250 μm [155]. Ainsi, des artères ou veines peuvent être construites avec cette technique, mais elle ne peut permettre la construction de capillaires dont le diamètre est de l’ordre de 5 à 20 μm . L’effondrement des structures lié à l’utilisation de biopolymère de faible rigidité et la déposition d’hydrogel liquide de faible viscosité peut cependant être résolu en imprimant la structure directement dans un bain gélifiant à l’image de l’instrument développé par Hinton et son équipe [156] (Figure 1.20C) ou Ghanizadeh *et al.* [157], les biopolymères étant généralement de l’alginate.

Cette technique offre la possibilité d’être utilisée en combinaison avec des sphéroïdes afin de concevoir des couches contenant de fibres alternant des lignes de sphéroïdes et des lignes de canaux creux bioimprimés permettant la perfusion et la diffusion de nutriments aux sphéroïdes (Figure 1.21).

Bioimpression assistée par laser

Deux techniques sont désignées par la bioimpression assistée par laser. La première technique utilise un laser pour exciter une surface fine de polymère, que l’on appelle un ruban, placée au-dessus (ou en-dessous) du support de construction. L’excitation par le laser sur la fine couche de polymère provoque le détachement de gouttes vers le substrat. Cette technique est appelée LIFT pour Laser-Induced Forward Transfer. L’utilisation d’un laser permet l’expulsion de très fines gouttes et donc une résolution très importante (Figure 1.22A) [158]. Guillotin *et al.* ont démontré la précision de la technique LIFT en plaçant une forte densité de cellules endothéliales sur un substrat et en formant différents motifs (Figure 1.22B) [135]. La seconde technique utilise un laser pour illuminer directement un bloc d’hydrogels et induire la photopolymérisation de l’hydrogel dans le volume d’excitation. Elle est couramment appelée stéréolithographie et atteint des résolutions de l’ordre du

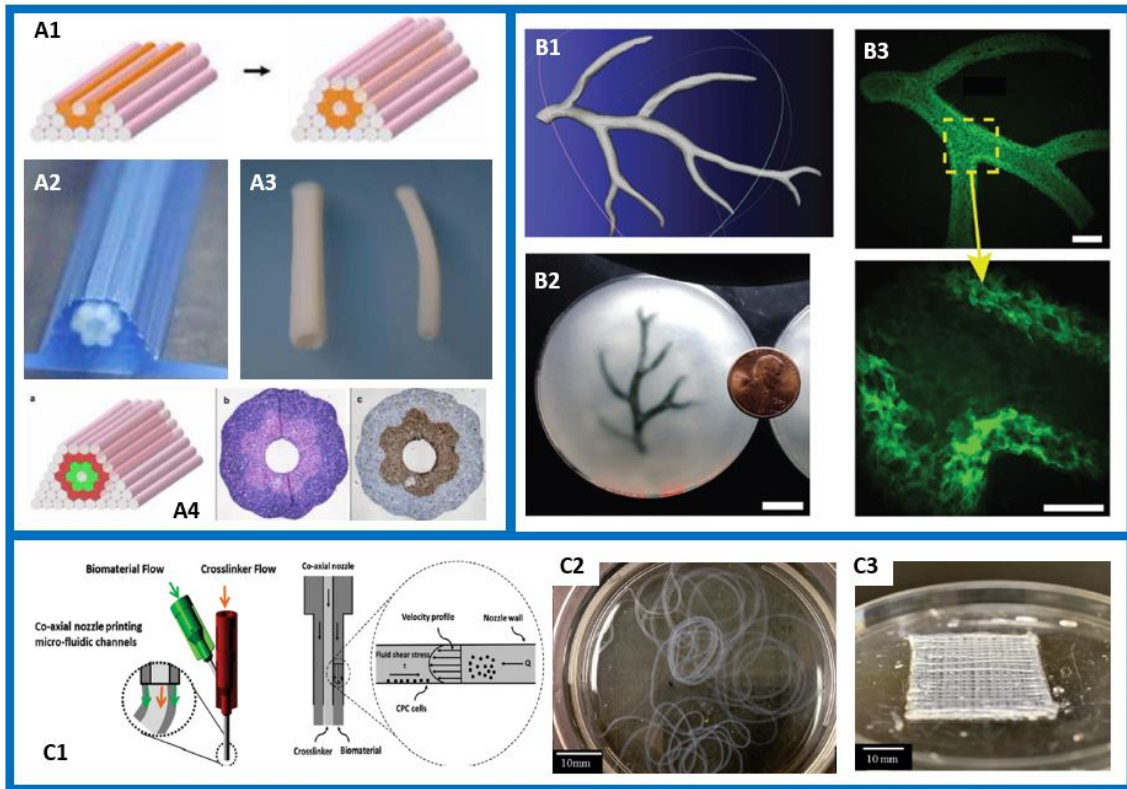


FIGURE 1.20 – Conception de tubes via la technique de bioimpression par extrusion. (A) Formation de tubes creux par empilement couche-par-couche de tiges de biopolymères [149]. (A1) Principe de la technique. (A2) Construction réalisée avec des tiges d'agarose (bleu) et des tiges d'un second hydrogel contenant des cellules de muscles lisses de porc (blanc). (A3) Construction 3 jours après la bioimpression (gauche : OD = 2,5 mm, droite : OD = 1,5 mm). (A4) Formation d'un vaisseau avec deux couches de parois : une couche externe contenant des fibroblastes et une couche interne contenant des cellules de muscles lisses. (B) Construction d'un modèle de l'arbre coronaire artériel droit [156]. (B1) Imagerie par résonance magnétique de l'arbre coronaire artériel (barre d'échelle = 10 mm). (B2) Exemple de l'arbre bioimprimé en alginate dans un support de gélatine (barre d'échelle = 2,5 mm). (B3) Imagerie fluorescente de l'arbre bioimprimé avec un alginate fluorescent et son zoom montrant la structure creuse développée (barre d'échelle = 1 mm). (C) Bioimpression directe de tubes creux. (C1) Principe de la bioimpression à l'aide de tubes coaxiaux [154]. (C2) Canaux d'alginate bioimprimé [152]. (C3) Impression de 8 couches de canaux d'alginate formant une grille épaisse.

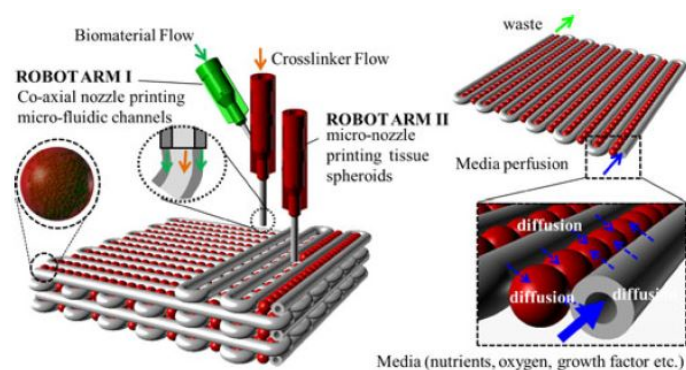


FIGURE 1.21 – Stratégie de bioimpression d’organe vascularisé par impression simultanée de sphéroïdes et canaux microfluidiques couche-par-couche. [145]

nanomètre [159, 160]. La photopolymérisation peut être appliquée au volume par illumination totale de l’échantillon et l’utilisation d’un masque ultraviolet ne permettant d’éclairer l’échantillon qu’au travers des motifs du masque, la polymérisation de l’hydrogel a donc lieu sur toute l’épaisseur de l’échantillon. La photopolymérisation peut néanmoins être activée de manière très précise dans le volume de l’échantillon par excitation localisée en utilisant une excitation bi-photon, par exemple. Que ce soit avec la technique LIFT ou la stéréolithographie, la polymérisation par laser permet de s’abstenir de l’utilisation d’embouts, et donc des possibilités de formation de bouchons. Ce type de bioimpression est ainsi compatible avec des biopolymères visqueux. Par contre, des limitations liées à la phototoxicité et aux radicaux de photopolymérisation résident.

Zhu *et al.* ont conçu une construction tissulaire prévascularisée d’approximativement $600\ \mu\text{m}$ d’épaisseur par stéréolithographie [161]. Par photo-polymérisation de deux polymères différents contenant chacun un type cellulaire, ils ont pu reproduire un motif de nid d’abeille (Figure 1.22D). Des cellules endothéliales sont incluses dans des tiges de biopolymère à section rectangulaire d’environ $100\ \mu\text{m}$ de largeur. Le second biopolymère contient des hépatocytes HepG2 et est gélifié à l’intérieur des motifs hexagonaux délimités par le premier biopolymère (Figure 1.22). Les cellules endothéliales incluses forment spontanément une structure comportant un lumen. Leur tissu *in vitro* a pu être implanté dans une souris et a montré une anastomose avec le réseau vasculaire de la souris. La stéréolithographie a également permis à Nikkhah *et al.* d’inclure des cellules endothéliales dans des lignes fines d’hydrogel de gélatine méthacrylate (GelMA) et de montrer l’alignement des cellules endothéliales le long de la direction des lignes formées [162]. L’équipe de Culver utilise des acquisitions d’images du réseau vasculaire de différents tissus : la cornée, le cortex cérébral et le coeur, et traite ces images afin de servir de guide à la bioimpression (Figure 1.23) [163]. Ainsi, ils ont pu bioimprimer la topologie de ces réseaux par lithographie bi-photon et reproduire des modèles de vascularisation au motif quasi-identique à celui *in vivo*. Ils ont pu recouvrir cette structure de cellules endothéliales et ont montré une organisation rapide des cellules en un réseau.

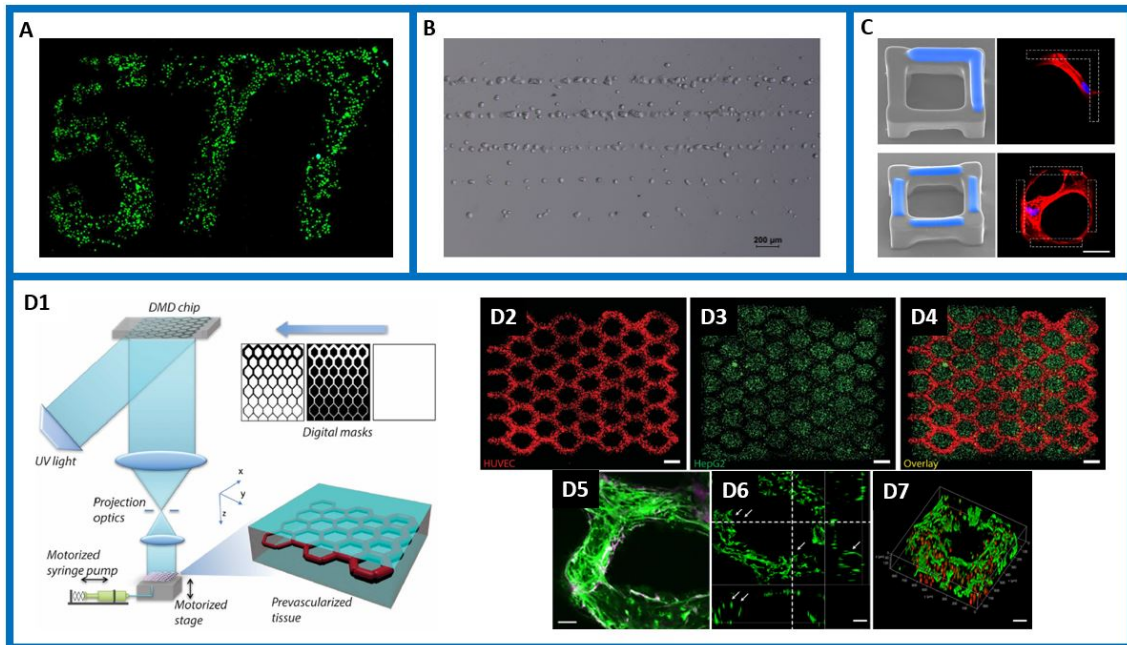


FIGURE 1.22 – Réalisations de l'impression assistée par laser.

(A) Test de viabilité sur des cellules endothéliales bioimprimées par laser [158]. (B) Cellules imprimées dans du Matrigel à la concentration de 10^8 cellules/mL. Chaque ligne est imprimée à une vitesse différente : respectivement 100, 200, 400, 800 et 1600 mm/s de bas en haut [135]. (C) Déposition de Matrigel (bleu) sur une structure afin de créer des motifs d'adhésion pour des cellules souches mésenchymateuses (f-actin marquée en rouge et noyaux en bleu) (barre d'échelle = $50 \mu\text{m}$) [160]. (D) Bioimpression laser de cellules endothéliales [161]. (D1) Schéma de la plateforme d'impression. (D2-D4) Images fluorescentes des cellules endothéliales (rouge) imprimées en un motif de nid d'abeille et des hépatocytes (vert) imprimées dans les pores du réseau (barre d'échelle = $250 \mu\text{m}$). (D5) Imagerie confocale des cellules endothéliales marquées en vert et des cellules de soutien mésenchymateuses marquées en violet. Les cellules endothéliales montrent un alignement. (barre d'échelle = $100 \mu\text{m}$) (D6) Section transverse des cellules endothéliales montrant des structures en forme de lumen (flèches blanches) (barre d'échelle = $100 \mu\text{m}$). (D7) Vue 3D des cellules endothéliales montrant un alignement le long des canaux bioimprimés. Les cellules endothéliales sont marquées en vert par le CD31 et en rouge par un traceur de fluorescence (barre d'échelle = $100 \mu\text{m}$).

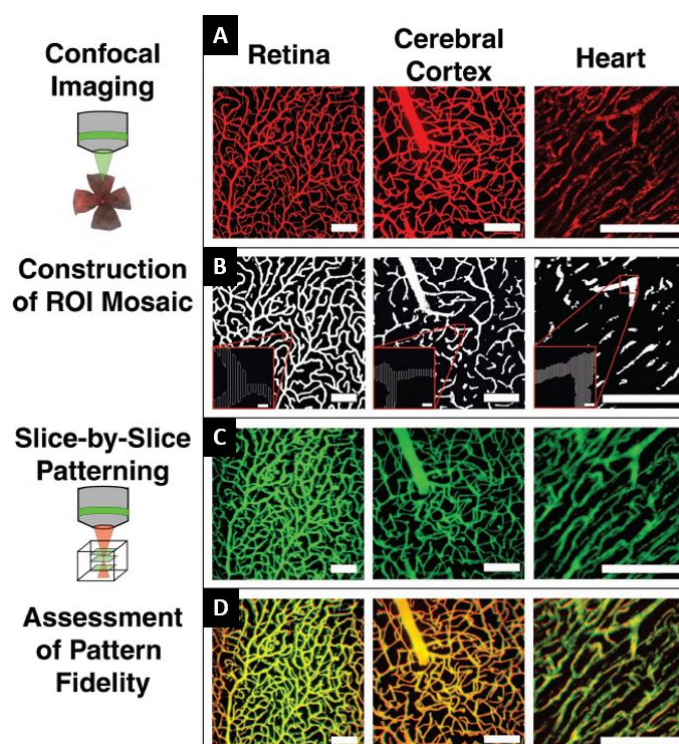


FIGURE 1.23 – Technique de conception de motifs pour la bioimpression de réseau vasculaire. [163]

(A) Imagerie confocale projetée afin d’obtenir le motif d’impression. (B) Reconstruction des images en un réseau vasculaire plan. (C) Bioimpression d’hydrogels PEG-PQ greffés avec du PEG-RGDS-488 (D) Superposition des images du réseau vasculaire et des images de bioimpression : le jaune indique une superposition entre les vaisseaux et le motif (barre d’échelle = 100 μm).

Concernant les désavantages de la bioimpression assistée par laser, ces techniques nécessitent un excédent en hydrogel pour imprimer une structure, et il est difficile de bioimprimer des tissus épais sans engendrer d'effondrement de la structure. De plus, l'équipement nécessaire est coûteux. La technique de LIFT utilise un ruban d'hydrogels dont la préparation est longue et difficile. La technique LIFT présente également une faible reproductibilité, limitant actuellement son utilisation clinique. Concernant la stéréolithographie, des photos-initiateurs sont insérés dans l'hydrogel et impactent la viabilité des cellules pendant et après l'impression [164].

Les techniques de bioimpression assurent l'intégration de forte densité cellulaire au sein des échafaudages construits. Cette forte densité permet la génération du tissu via la sécrétion de biomolécules par les cellules. La bioimpression permet d'incorporer de fortes quantités de cellules de manière contrôlée. Cependant, il reste encore à prouver que les techniques de bioimpression ne sont pas toxiques et ne causent pas de dommages irréversibles aux cellules [165]. De plus, les constructions de tissus doivent rapidement évoluer en des tissus matures, stables et fonctionnels pouvant être perfusés. Cette étape de maturation des tissus doit être développée et prise en compte lors de la bioimpression de modèles tissulaires [166].

1.3.3.2 Assemblage modulaire

La réussite de l'élaboration d'un tissu *in vitro* dépend de plusieurs facteurs dont le plus important est l'accessibilité aux nutriments et à l'oxygène pour les cellules. Cette accessibilité dépend de la présence d'un canal de transport perfusant ces composés à une distance de 200 à 400 μm de chaque cellule. Une distribution homogène et dense de différents types cellulaires dans la construction tissulaire est aussi nécessaire. L'assemblage modulaire est une stratégie de conception de tissus à l'échelle macroscopique par empilement de sous-unités tissulaires microscopiques. Cette approche consiste en la conception de micro-unités (ou modules, ou micro-environnements) représentatives de l'environnement tissulaire *in vivo* et en l'empilement de ces objets afin de concevoir un "macro-environnement" se développant en un tissu fonctionnel. L'empilement des micro-environnements forme un ensemble solide parcouru d'espace poreux. Ainsi, la perfusion des pores par du milieu de culture ou du sang assure l'approvisionnement des cellules contenues dans chaque module. En veillant à concevoir des modules de sorte à ce que tout point intérieur du volume soit situé à une distance inférieure à la limite de diffusion de l'oxygène, on s'assure ainsi de l'approvisionnement de toutes les cellules incluses dans les biopolymères (Figure 1.24a) [167].

Le premier exemple de l'utilisation de cette technique est attribué à Sefton et McGuigan qui ont construit des micro-unités cylindriques de collagène contenant des hépatocytes et recouvertes d'une couche de cellules endothéliales (Figure 1.24b,c,d & e) [168]. La dimension finale des cylindres après recouvrement par les cellules endothéliales et culture durant 3 jours atteint un diamètre de 410 μm de diamètre et 620 μm de longueur. Leurs

microenvironnements ont été empilés au sein d’un tube plus large dans lequel du milieu de culture a pu circuler au sein des pores interstitiels formés par l’empilement aléatoire de cylindres. Le recouvrement des modules avec des cellules endothéliales améliore le biomimétisme du microenvironnement développé. Les modules peuvent cependant adopter d’autres formes et structures : de nombreuses techniques sont développées afin de les concevoir [169, 170, 171]. L’utilisation de moules, la photopolymérisation, l’auto-assemblage des cellules ou la microfluidique sont autant de techniques permettant le développement de micro-unités contenant des cellules. Du *et al.* ont présenté une technique afin de concevoir des modules à partir de plusieurs composants, avec des formes variées [172, 173].

Quelques études utilisent la conception de micro-environnements tissulaires à des fins d’implantation *in vivo*. Cooper et Sefton ont développé des modules tissulaires de collagène recouverts de cellules endothéliales destinés à être implantés dans la souris. Leur étude a montré la formation de vaisseaux 7 à 14 jours après implantation et a révélé qu’un recouvrement des modules avec de la fibronectine améliorerait la survie des cellules endothéliales et augmentait la formation de vaisseaux post-implantation [175]. Chamberlain *et al.* ont poursuivi cette étude en démontrant que l’encapsulation de cellules stromales mésenchymateuses dérivées de la moëlle épinière (bmMSCs) dans les modules améliorerait la formation de vaisseaux *in vivo* ainsi que la perméabilité et la maturité des vaisseaux [176].

Cependant, l’empilement aléatoire de ces modules est surtout utilisé *in vitro* afin d’accumuler les microenvironnements et concevoir une construction tissulaire vascularisée. Par exemple, Agarwal *et al.* ont construit des microsphères avec plusieurs compartiments : un coeur de collagène contenant des cellules tumorales et une couche périphérique d’alginate [177] qu’ils ont empilées dans une carte microfluidique. L’espace interstitiel a été comblé par du collagène contenant des cellules endothéliales et des cellules souches dérivées de tissus adipeux humains (hADSCs). Ces cellules souches se présentent dans le stroma des tumeurs cancéreuses du sein *in vivo* et influencent positivement la vascularisation. Cette configuration permet la sécrétion de nombreux facteurs de croissances endothéliaux par les cellules hADSCs ainsi que par les cellules tumorales, permettant un auto-assemblage des cellules endothéliales en un réseau vasculaire. Cependant, le réseau vasculaire développé n’est pas perfusable, et leur stratégie ne permet pas de tirer parti de l’espace interstitiel créé par l’empilement de modules afin d’alimenter les cellules encapsulées. L’empilement des microenvironnements recouverts de cellules endothéliales crée un réseau de canaux endothélialisés interconnectés. Ainsi, en accumulant les modules au sein d’un moule possédant la morphologie du tissu souhaitant être reproduit, l’empilement permet le placement de nombreuses composantes essentielles à la fonction d’un tissu dans une morphologie globale adaptée. Par exemple, Khan *et al.* ont placé plusieurs micro-cylindres au sein d’un bioréacteur construit à partir d’un foie de rat (Figure 1.24f) [174]. Leur construction a ainsi pu reproduire l’environnement du foie et a été perfusée durant 3 jours en conservant la viabilité des cellules encapsulées. La perfusion d’un empilement de sphéroïdes recouvertes de cellules endothéliales afin d’approvisionner les cellules encapsulées a également été pratiquée par Inamori *et al.*, et a mis en valeur une viabilité améliorée dans certaines

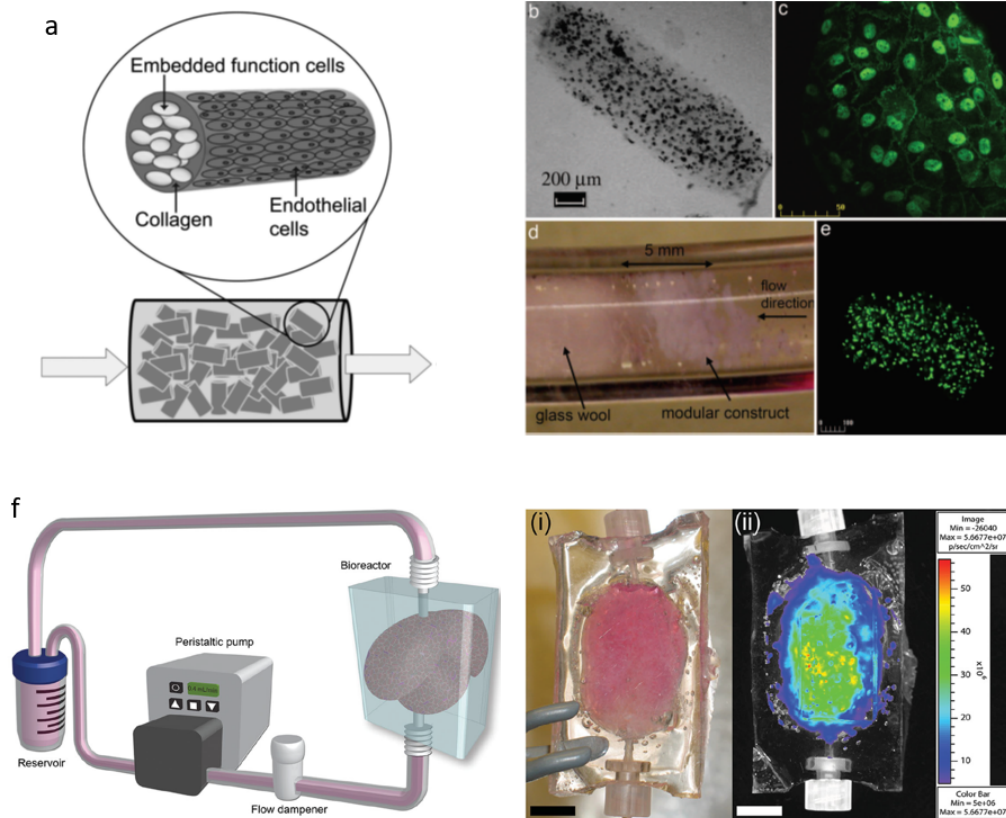


FIGURE 1.24 – Conception de construction tissulaire par assemblage de micro-modules. (a) Schéma d'un module cylindrique de collagène incorporant des cellules de tissu et recouvert de cellules endothéliales. [167]. (b) Module cylindrique de collagène encapsulant des cellules hépatiques (barre d'échelle = $200 \mu\text{m}$). [168]. (c) Microscopie confocale de la VE-cadhérine marquant les cellules endothéliales après 7 jours de culture. (d) Empilement des unités modulaires dans un circuit microfluidique perfusé. (e) Image confocale de la fluorescence des hépatocytes après 7 jours de perfusion de milieu dans l'empilement. (f) Bioréacteur adoptant la forme d'un foie de rat rempli de modules incorporant des cellules L929 et recouverts de cellules endothéliales. [174]

zones de l’empilement, synonyme de la perfusion de milieu [178]. Zhong *et al.* ont eu l’idée d’empiler des microsphères de collagène contenant des ostéoblastes et recouvertes de cellules endothéliales avec des microsphères sacrificielles de taille plus petite afin d’augmenter l’espace interstitiel de l’empilement créé [179]. Ils mettent ainsi en avant le développement rapide d’un modèle d’ostéon pré-vascularisé.

L’empilement de modules forme un ensemble solide à porosité ouverte. Les canaux interstitiels formés par l’assemblage des sous-unités sont de faibles dimensions, et la section moyenne des pores peut être ajustée au diamètre des capillaires *in vivo*. De plus, le recouvrement des modules avec des cellules endothéliales montre une formation rapide de jonctions et une association en un réseau de canaux au sein de l’espace interstitiel. Ainsi, l’assemblage modulaire permet une construction rapide et efficace d’un réseau de canaux endothélialisés au sein d’un ensemble tissulaire épais. Cependant, l’empilement repose sur une composante aléatoire, et, à l’image de la technique d’auto-assemblage, le contrôle sur le réseau développé est limité : deux réseaux vascularisés réalisés dans les mêmes conditions ne vont pas fournir une structure identique. Le désavantage principal de cette technique réside aussi en la difficulté à former une couche homogène de cellules endothéliales recouvrant la totalité des microenvironnements tissulaires, résultant en la formation d’un réseau vasculaire possédant des fuites. De plus, à notre connaissance, aucune étude n’a montré le développement d’un tissu fonctionnel perfusable pendant plus d’une semaine avec la technique d’assemblage modulaire.

1.3.4 Bilan récapitulatif

Chacune des techniques citées précédemment présente ses propres forces qui doivent être combinées afin de reproduire un modèle microvasculaire *in vitro* optimal : une géométrie vasculaire spécifique doit être conçue tout en répliquant l’environnement biochimique et biomécanique. De nombreuses techniques permettent d’implémenter une géométrie complexe dans du PDMS, mais l’environnement est mieux reproduit dans des hydrogels. Les canaux possédant des géométries non-physiologiques ou des propriétés mécaniques et biochimiques non-physiologiques induisant des dysfonctions endothéliales [180, 181]. La complexité est d’autant plus importante quand ces complexités doivent être intégrées dans des constructions d’organes, dans lesquels la microvascularisation doit être fabriquée parmi une large variété de micro et macroenvironnements [182].

L’ensemble des techniques présentées dans cette section avec les forces et faiblesses associées est résumé dans le tableau 1.1.

Tableau 1.1 – Les différentes techniques de conception d'un réseau vasculaire

Catégorie	Les techniques de vascularisation	Avantages	Inconvénients	Temps de préparation	Diamètre atteignable des vaisseaux	Dimension du tissu (x,y,z)	Temps de formation du tissu	Complexité du tissu (cellules & ECM)	Complexité de mise en œuvre	Accessibilité
Auto-assemblage	Vasculogénèse	Réseau vasculaire physiologique Dimension des capillaires Réseau 3D	Pas de contrôle sur la forme du réseau Formation lente Pas intégrable à une construction tissulaire épaisse	Rapide : < 30 minutes	10-50 µm	Largueur : 1000 µm Longueur : > mm Épaisseur : 250 µm	4 jours - 2 semaines	Hydrogel représentatif de l'ECM encapsulant des fibroblastes perfusés d'un réseau vasculaire Sphéroïde pouvant être cultivée sur l'hydrogel	Concentration des cellules à ajuster Hydrogel optimal à déterminer	Expérimentateur entraîné
	Angiogenèse	Réseau vasculaire physiologique Dimension des capillaires Réseau 3D	Pas de contrôle sur la forme du réseau Formation lente Pas intégrable à une construction tissulaire épaisse	Rapide : < 30 minutes	10-50 µm	Largueur : 700 µm Longueur : > mm Épaisseur : 100 µm	4 jours - 2 semaines	Hydrogel représentatif de l'ECM encapsulant des fibroblastes perfusés d'un réseau vasculaire Sphéroïde pouvant être cultivée sur l'hydrogel	Concentration des cellules à ajuster Hydrogel optimal à déterminer	Expérimentateur entraîné
	Substrat plan	Simple à développer Reproduction rapide d'interface	Endothélium plan	Rapide : < 30 minutes			Endothélisation en 1 jour	Couche de cellules endothéliales sur une paroi rigide	Concentration des cellules à ajuster	Simple
Recouvrement de canal creux	Aligette en tant que motif	Simple à développer Reproduction rapide de canal creux	Dimension Pas utilisable pour construction tissulaire épaisse Propriétés capillaires moins physiologiques que l'auto-assemblage	Une demi-journée	60-200 µm	Largueur/Épaisseur : 500 µm Longueur : embout de l'aiguille	Endothélisation en 1 jour	Hydrogel représentatif de l'ECM intégrant des cellules du tissu d'intérêt perfusé d'un réseau de tubes creux recouverts de cellules endothéliales	Concentration des cellules à ajuster	Simple
	Bioimpression d'encre sacrificielle	Réseau 3D complexe Implémentation dans épais	Dimensions Propriétés capillaires moins physiologiques que l'auto-assemblage	Une journée	200 µm	cm3	Endothélisation en 1 jour	Réseau de canaux creux endothélialisés dans un hydrogel représentatif de l'ECM	Conception de la bio-encre Ajustement des paramètres de la machine Concentration de cellules à injecter Formats de bouchons lors du recouvrement de petits canaux	Expérimentateur entraîné
	Stérolithographie	Réseau 3D complexe	Propriétés capillaires moins physiologiques que l'auto-assemblage	Une journée	100 µm	Plusieurs cm2 Épaisseur faible	Endothélisation en 1 jour	Réseau de canaux creux endothélialisés dans un hydrogel représentatif de l'ECM	Difficulté à concevoir un tissu épais Format de bouchons dans les petits canaux	Expérimentateur entraîné
Fabrication additive	Bioimpression goutte-à-goutte	Réseau 3D complexe Possibilité de former des tissus épais Industrialisable	Résolution faible Viscosité de la bioencre Dommages cellulaires lors de la bioimpression Pré-vascularisation Pas perfusable	Rapide : < 2 heures	> 200 µm		Formation du tissu : quelques heures + auto-assemblage des cellules en capillaires	Placement de plusieurs ECM contenant des cellules endothéliales Introduction de bulles d'air Les cellules endothéliales doivent ensuite s'auto-assembler	Formation de bouchons dans les aligettes Introduction de bulles d'air Choix de la viscosité de l'encre Conception de la bioencre	Expérimentateur entraîné
	Bioimpression par extrusion	Accessibilité Possibilité de former des épais	Résolution faible Viscosité de la bioencre Dommages cellulaires lors de la bioimpression Pré-vascularisation Pas perfusable	Rapide : < 2 heures	> 250 µm		Formation du tissu : quelques heures + auto-assemblage des cellules en capillaires	Placement de plusieurs ECM contenant des cellules endothéliales Introduction de bulles d'air Les cellules endothéliales doivent ensuite s'auto-assembler	Formation de bouchons dans les aligettes Introduction de bulles d'air Choix de la viscosité de l'encre Conception de la bioencre	Expérimentateur entraîné
	Bioimpression par laser	Résolution Réseau 3D complexe	Cytotoxicité des photo-initiateurs Coût des machines Rendement faible Pré-vascularisation Pas perfusable	Rapide : < 2 heures		Plusieurs mm2 Épaisseur faible	Formation du tissu : quelques heures + auto-assemblage des cellules en capillaires	Placement de plusieurs ECM contenant des cellules endothéliales Les cellules endothéliales doivent ensuite s'auto-assembler	Choix de la viscosité de l'encre Conception de la bioencre	Expérimentateur entraîné
	Assemblage moléculaire	Conception de tissus épais Formation simultanée à la culture des cellules du tissu d'intérêt	Perturbabilité des capillaires difficilement reproductible Section poreuse variable	Une demi-journée	50 µm	Physiologique (adaptable à toute dimension de chambre)	Endothélisation en 1 jour	Milieu poreux formé à partir d'hydrogel représentatif de l'ECM dont les pores sont recouverts de cellules endothéliales.	Formation des modules d'hydrogel Difficulté de conception d'un endothélium recouvrant la totalité de l'espace interstitiel	Expérimentateur entraîné

1.4 Les reproductions d’organes & tissus

Le réseau vasculaire joue un rôle primordial dans l’homéostasie des organes et dans les pathologies. La conception de réseau vasculaire est ainsi d’intérêt pour la compréhension des mécanismes de régulation de chaque tissu et son implication dans les maladies. La revue de Kinstlinger et Miller fournit une présentation détaillée des applications nécessitant le développement de ce réseau (Figure 1.25) [183]. La recherche sur le cancer est une des thématiques essentielles nécessitant sa conception, de par son implication dans la prolifération et la migration tumorale. Le développement du système vasculaire permet le développement de tissus physiologiques pouvant servir de plateformes de tests plus fiables que les modèles animaux pour le criblage de molécules thérapeutiques. La génération de tissus sains vascularisés offre également la promesse de création d’implants potentiels soit en tant que substituts à des tissus non fonctionnels, soit en tant que soutien promoteur de la régénération d’organes.

Le développement de tissus sains *in vitro* repose sur l’incorporation des différents éléments du tissu *in vivo* et sur l’approvisionnement des cellules. Les tissus doivent inclure des vaisseaux sanguins délivrant les nutriments, l’oxygène, les facteurs de croissance et les hormones aux cellules à des taux physiologiques afin d’adopter un phénotype au plus proche du *in vivo*. De plus, chaque organe fonctionne en relation étroite et possède une interaction unique avec le réseau vasculaire. Ce réseau est essentiel à la bonne fonctionnalité de l’organe. Ainsi, la majorité des conceptions de tissus et d’organes cherche à développer une vascularisation. Osaki *et al.* présentent un rapide tour d’horizon des différents modèles d’organes vascularisés [185]. Nous présentons rapidement quelques-uns des modèles d’organes mimés par les représentations tissulaires vascularisées.

1.4.1 Les modèles d’organes & tissus

Poumon

Les poumons jouent un rôle essentiel dans la respiration et l’oxygénation du sang. L’oxygénation du sang s’effectue au niveau des alvéoles pulmonaires. Des capillaires sanguins reposent sur les alvéoles pulmonaires et les mouvements de contraction/étirement engendrés par la respiration permettent la diffusion de l’oxygène de l’alvéole vers le capillaire et la diffusion du dioxyde de carbone du sang vers l’alvéole. La majorité des reproductions de poumons *in vitro* s’attache à la modélisation de l’interface alvéole/capillaire. Cette interface a notamment été reproduite dans le poumon-sur-puce développé par Huh *et al.* [101] qui constitue à ce jour le modèle le plus avancé d’un microenvironnement pulmonaire *in vitro*. Le réseau vasculaire est reproduit par le développement d’une couche de cellules endothéliales sur une membrane semi-perméable, et la paroi des alvéoles est reproduite par une couche de cellules épithéliales. Ce modèle a permis l’étude de la diffusion d’aérosols au travers la membrane endothéliale/épithéliale, de l’évolution de la perméabilité suite à un stress inflammatoire, et de la formation d’oedème pulmonaire [186].

Les dispositifs actuels de reproduction d’un microenvironnement pulmonaire miment

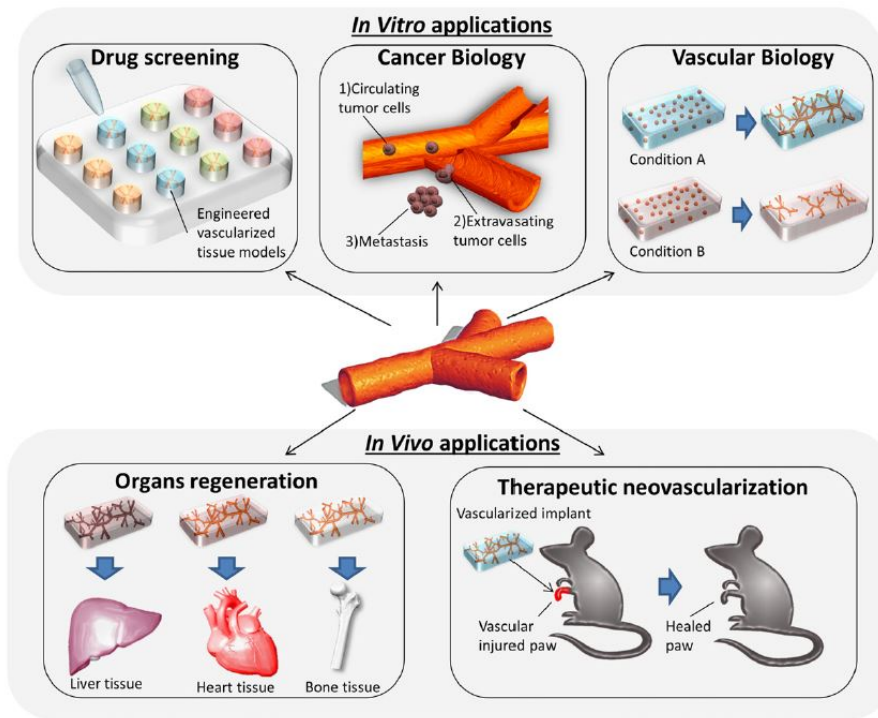


FIGURE 1.25 – Les applications biologiques liées au développement d'un système vasculaire [184].

l'interface alvéo-capillaires mais présentent des limites liées au fait que la morphologie et les dimensions de la structure *in vivo* ne sont pas respectées. L'interface plane développée permet uniquement le déplacement rectiligne de flux gazeux. Or la structure en acinus d'une alvéole pulmonaire impacte les lignes de courant du flux gazeux pénétrant l'alvéole, de même que la perméabilité de l'épithélium et endothélium. De plus ces systèmes ne respectent pas les dimensions microscopiques des capillaires ce qui ne permet pas de reproduire précisément les interactions entre l'endothélium et l'épithélium, ainsi que la vitesse des fluides et les forces de cisaillement physiologiques. Ces paramètres influencent le phénotype des cellules.

Cerveau

De l'augmentation de l'espérance de vie découle une augmentation des maladies neurovasculaires liées à la vieillesse. De nombreux médicaments sont donc recherchés. Cependant, la faible perméabilité de la barrière hémato-encéphalique constitue la cause principale de l'échec de la délivrance de médicaments. La barrière hémato-encéphalique protège le système nerveux central. Elle permet la sélection précise des nutriments dont le cerveau a besoin et empêche le passage des composés nocifs. Sa détérioration est également impliquée dans de nombreuses maladies comme Alzheimer, Parkinson ou encore la démence [187]. Des dispositifs reproduisant cette barrière sont ainsi conçus afin de valider ou non le passage des nouveaux traitements au travers de cette membrane ou d'élucider les mécanismes

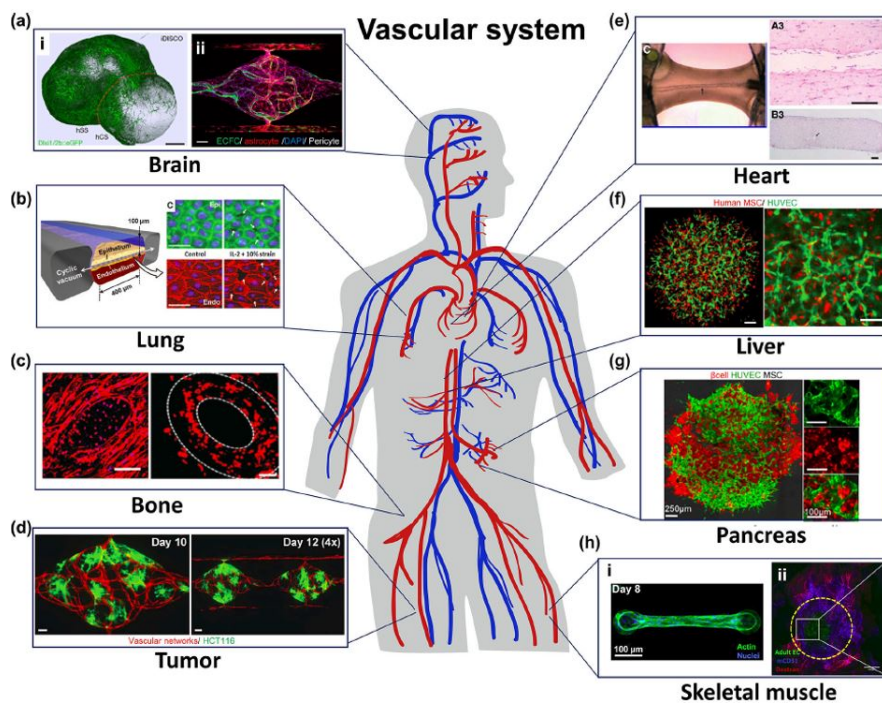


FIGURE 1.26 – Aperçu de modèles prévascularisés et vascularisés de micro-tissus du cerveau (a), poumon (b), os (c), tumeur (d), cœur (e), foie (f), pancréas (h) et muscle squelettique (h).[185].

de ces maladies. La revue de Wolff *et al.* établit une liste très détaillée des modèles de la barrière hémato-encéphalique développés en carte microfluidique [188] et peut être complétée par celle proposée dans la mini-revue de Phan *et al.* [187]. Ces modèles reproduisent uniquement l'interface entre le réseau sanguin et le cerveau ; la conception de tissus épais fonctionnels est beaucoup plus complexe.

Le développement de tissu cérébral est nécessaire afin d'étudier la complexité de cet organe, mais de cette complexité découle la difficulté à reproduire de tels modèles. Les premiers outils d'études des tissus cérébraux *in vitro* reposent sur l'utilisation de sphéroïdes [189, 190] ou organoïdes [191]. Par exemple, la fusion de deux organoïdes cérébraux a été provoquée en les positionnant l'un à côté de l'autre afin de mimer plus précisément la physiologie du cerveau [192]. Cependant, ces organoïdes ne permettent pas le développement de tissus matures. Notamment, aucun modèle n'a, à l'heure actuelle, réussi à développer une vascularisation de ces unités sphériques ou réussi à reproduire certains processus neuronaux comme la gliogénèse, essentiels à l'homéostasie du cerveau [193] et à sa survie à long-terme [194]. Phan *et al.* ont tout de même conçu un microenvironnement neuronal perfusant un réseau de capillaires sanguins en promouvant l'auto-assemblage de cellules endothéliales dans un gel contenant des péricytes et des astrocytes [187].

Foie

Une des raisons principales de l'échec des tests de médicaments lors du passage de l'homme à l'animal est l'hépatotoxicité du médicament créant des dommages aux cellules du foie [195, 196]. Le développement de modèles de foie est alors d'un grand intérêt afin de vérifier l'impact potentiel de nouvelles molécules thérapeutiques sur cet organe.

Cependant, les cellules du foie sont en pratique connues pour être difficile à maintenir en culture *in vitro*, les hépatocytes perdent notamment rapidement leur phénotype dans des cultures en 2 dimensions [197]. La culture de sphéroïde est la stratégie principalement utilisée afin de maintenir le phénotype des hépatocytes et d'étendre leur durée de vie [198], mais reste limitée à 3 semaines de culture au maximum. L'utilisation de cellules de lignées ou de cellules souches peut permettre d'améliorer la culture des cellules de foie [199]. La création de microenvironnement de foie similaire au *in vivo* permettrait de maintenir en culture ces cellules à long terme afin de faciliter les expériences de recherche. L'encapsulation de cellules hépatiques au sein de microsphères d'hydrogel et leur culture dans des bioréacteurs permettent de maintenir le phénotype des hépatocytes en recréant un microenvironnement de foie [200, 201, 202].

La conception d'une vascularisation perfusant des sphéroïdes de foie ou un micro-tissu est nécessaire afin d'obtenir des phénotypes matures et stables. No *et al.* présentent les différents modèles de foie élaborés en 3D [196]. Les principales stratégies de vascularisation à l'heure actuelle reposent sur l'incorporation de cellules endothéliales au sein des sphéroïdes de foie et en la greffe de ces unités *in vivo*. Les cellules endothéliales contenues dans la sphéroïde s'auto-organisent alors dans le corps de l'hôte et forment un réseau capillaire [203, 204]. Sasaki *et al.* emploient une stratégie similaire en empilant des couches d'hépatocytes, de fibroblastes et de cellules endothéliales séparées par des fines couches de gélatine

et de fibronectine. Ils ont montré la formation d’un réseau vasculaire et d’une anastomose avec le système vasculaire de la souris [205]. La plupart des stratégies de vascularisation de modèles tissulaires de foie se basent sur l’incorporation de cellules endothéliales et l’auto-assemblage après implantation *in vivo*. En revanche, la conception d’un modèle de foie perfusé d’un réseau vasculaire *in vitro* n’a toujours pas été réalisée.

Une stratégie très prometteuse consiste en la décellularisation d’un foie. Cette technique enlève les cellules de l’organe mais conserve sa structure fournissant un échafaudage décellularisé possédant le réseau vasculaire, les voies biliaires, la matrice extracellulaire et la structure globale intacte [206, 207, 208, 209]. La structure peut être repeuplée de cellules dans un second temps mais des difficultés de recellularisation de la structure complète sont rencontrées, il est ainsi difficile de reformer l’endothélium. A ce problème s’ajoute une manque d’accès aux cellules en quantité suffisante ainsi que des problèmes de rejet suivant l’éventuelle transplantation.

Rein

L’insuffisance rénale est un des problèmes de santé majeur du monde actuel de par son fort taux de mortalité engendré. Les traitements actuels sont limités aux dialyses afin de suppléer le rein défaillant ou la transplantation se confrontant au manque de donneurs, aux complications provoquées par les greffes et parfois aux rejets de l’organe transplanté. De nouvelles stratégies thérapeutiques sont alors recherchées. L’ingénierie tissulaire et la médecine régénérative offrent la promesse de développer des tissus rénaux fonctionnels pouvant remplacer les cellules endommagées et restaurer la fonction d’un rein sain. Cependant, la bonne fonctionnalité du rein est liée à sa composition complexe ce qui rend difficile sa reproduction et constitue un frein à la conception de tels substituts. Une revue détaillée présente les différentes approches thérapeutiques de traitement des maladies liées au rein [210].

Le rein possède 3 fonctions principales : il purifie le sang en éliminant les déchets produits par l’organisme dans l’urine, il filtre l’eau afin d’équilibrer les sels minéraux et il produit des protéines agissant sur la pression artérielle et la formation de globules rouges. La réabsorption de l’eau, des sels et des solutés organiques ainsi que l’élimination des déchets endogènes et exogènes du corps s’effectuent dans les tubules proximaux. Une forte concentration en xénobiotiques (substances étrangères à l’organisme) est ainsi présente dans ces tubules. Le tubule proximal est donc la cible principale de la toxicité des médicaments et doit être évalué lors du développement de nouvelles molécules thérapeutiques. C’est pourquoi les modèles de rein se concentrent majoritairement sur la conception de tubule rénal afin d’étudier l’absorption des molécules et la perméabilité de la barrière sang/rein.

Legallais *et al.* comparent les paramètres des modèles de reins bioartificiels [211]. Ces modèles n’incluent pas un réseau microvasculaire perfusable. Certaines constructions intègrent un réseau tubulaire de perfusion mais le diamètre des pores de perfusion est de l’ordre de 200 μm , soit environ 10 fois plus que le diamètre des capillaires physiologiques. Une possibilité de conception de rein bioartificiel réside en l’utilisation d’organes décél-

lularisés, mais les difficultés de revascularisation des matrices limitent actuellement leur utilisation.

Coeur

Le coeur assure la circulation du sang dans l'organisme. Il est composé de cardiomyocytes qui consomment à elles-seules 10% de tout l'oxygène fourni à l'organisme. Cette forte consommation en oxygène est permise par un réseau vasculaire très dense au sein de ce muscle. De nombreux modèles de coeur *in vitro* se concentrent essentiellement sur l'étude de la contractilité des cardiomyocytes mais ne développent pas de vascularisation [212, 213]. Le développement d'un réseau vasculaire au sein des tissus cardiaques et la reproduction des interactions entre cellules endothéliales et cardiomyocytes s'avèrent essentiels à l'adoption d'une réponse phénotypique proche du *in vivo* [214]. En effet, un rôle protecteur des cardiomyocytes par les cellules endothéliales via le relargage d'oxide nitrique est suspecté. Ainsi, des tests de cytotoxicité sur des tissus cardiaques non vascularisés ne peuvent être menés.

Un modèle de vascularisation de tissus cardiaques peut être développé via la tri-culture de cardiomyocytes, de cellules endothéliales et de fibroblastes dans une sphéroïde [215], reprenant la stratégie de Sasaki présentée précédemment, pour former un modèle de foie pré-vascularisé. Une autre approche consiste en la culture de cardiomyocytes sur un lit capillaire pré-développé [216]. Cependant la plupart de ces modèles ne permettent pas de mesurer les fonctions cardiaques nécessaires pour vérifier l'établissement d'une fonction physiologique. Vollert *et al.* ont développé un modèle cardiaque perfusé d'un canal endothélialisé conçu en utilisant un tube sacrificiel d'alginate traversant le tissu [217].

Os

L'os est un organe vivant composé de cellules et joue un rôle de soutien et de stockage des minéraux. Les tissus osseux sont composés de deux parties : une partie centrale à la résistance faible, que l'on appelle os spongieux, et riche en cellules conjonctives adipeuses et en capillaires sanguins, et une partie périphérique dense et résistante, que l'on appelle os compact. L'os compact est formé de tubes cylindriques alignés le long de l'axe de l'os que l'on appelle ostéons, dont la paroi épaisse est composée d'ostéocytes. Le canal central est appelé canal Haversian et mesure approximativement 50 μm de diamètre. Ce canal central est parcouru par des vaisseaux sanguins. Les vaisseaux des canaux Haversian longitudinaux sont reliés entre eux par les canaux de Volkmann (ou canaux perforants) dont le réseau sanguin alimente les ostéons (Figure 1.27). L'os est ainsi un organe fortement vascularisé. L'angiogenèse joue notamment un rôle essentiel dans la régénération et la réparation des os. L'arbre vasculaire en développement maintient non seulement l'homéostasie de l'os en approvisionnant les cellules en oxygène et nutriments, mais sert également de transport aux cellules inflammatoires, au cartilage et aux progéniteurs osseux devant être réparés [218, 219].

La reproduction de tissus osseux vascularisés *in vitro* repose sur l'incorporation de cellules osseuses au sein d'une matrice extracellulaire optimisée. La bioimpression 3D est

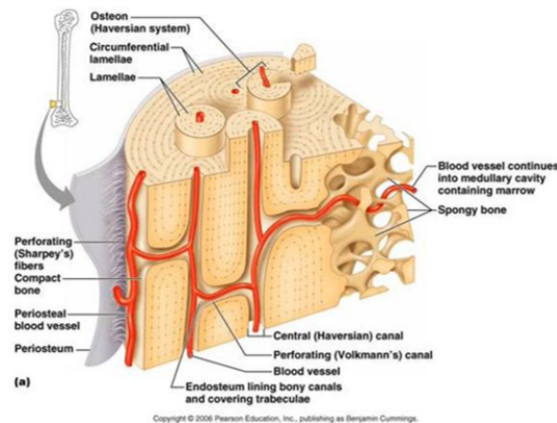


FIGURE 1.27 – Structure de l’os.

généralement utilisée afin de reproduire des vaisseaux larges et est donc utilisée pour la vascularisation du canal Haversian. Par exemple, Cui *et al.* combinent la biopression laser et la bioimpression par extrusion afin de déposer des fibres de polylactides (PLA) et de la gélatine méthacrylate (GelMA) contenant des cellules [220]. Afin de reproduire le réseau capillaire des canaux de Volkmann, les techniques d’auto-assemblages des cellules endothéliales s’avèrent plus efficaces [221, 222, 223]. Des modèles de cancer sont également développés. Par exemple, Bersini *et al.* ont favorisé la différenciation de cellules souches en ostéoblastes dans un gel contenant des cellules cancéreuses mammaires au sein d’une chambre microfluidique centrale bordée de canaux microfluidiques [224]. Les canaux microfluidiques ont ensuite été recouverts de cellules endothéliales et les métastases et l’extravasation des cellules cancéreuses ont été analysées. Un modèle proche a également été développé par Jeon *et al.* pour étudier l’extravasation de cellules cancéreuses [225].

1.4.2 Bilan récapitulatif

De nombreux modèles de tissus et d’organes ont été développés. La technique de vascularisation utilisée doit dépendre de l’application visée et de l’environnement tissulaire que l’on souhaite recréer. Le macroenvironnement doit être reproduit au plus proche du *in vivo* afin de prodiguer aux cellules les stimuli leur conférant leur bonne fonctionnalité et éviter leur différenciation en un état non souhaité. Un récapitulatif des différents tissus élaborés et des organes-sur-puces conçus est proposé Table 1.2.

De par la complexité du cerveau, les modèles de cet organe reproduisent généralement l’interface de la barrière hématoencéphalique afin d’étudier la perméabilité de l’endothélium et la possible invasion ou non de molécules dans le cerveau par traversée de cette barrière. De même, les études du poumon et du rein reproduisent généralement une barrière vasculaire afin de reproduire la perméabilité des vaisseaux sanguins au niveau de ces organes. Les modèles de poumons permettent d’étudier la diffusion d’aérosols des alvéoles vers le sang et les modèles de rein étudient généralement les capacités de filtration. Concer-

nant l'os, de nombreux modèles reposent sur la co-culture de plusieurs cellules du microenvironnement osseux au sein d'un gel adapté. Les puces osseuses servent grandement à l'étude de l'extravasation de cellules cancéreuses. La reproduction de microenvironnement tumorale est une catégorie non présente dans le tableau, mais comprend de nombreuses études. Par exemple, les puces de développement de réseau vasculaire par auto-assemblage sont souvent utilisées pour l'étude de l'intravasation de cellules cancéreuses [226, 227]. Mimetis propose notamment une application de test de molécules thérapeutiques pour le cancer du sein avec leur puce Organoplate[®].

Tableau 1.2 – Modèles d’organes développés et pertinence/limite des dispositifs

Organe / tissu mininé	Technique de vascularisation employée	Description du dispositif	Pertinence biologique	Limitations du modèle	Référence
Coeur	Auto-assemblage angioférése	Culture de cardiomyocytes sur un lit vasularisé	Réseau vasculaire perfusable Contact ECs / cardiomyocytes Reproduction de caractéristiques cardiaques	Formation du réseau en 14 jours Epaisseur de 100 μm Non adaptable pour tissu épais	[216]
	Auto-assemblage vasculogénèse	Culture d’une triple couche d’ECs et cardiomyocytes sur un lit vasularisé	Réseau vasculaire perfusable Contact ECs / cardiomyocytes Anastomose observée <i>in vitro</i>	3 jours par formation des triples-couches	[228]
Poumon	Recouvrement de canaux creux	Réseau de canaux creux conçu par stéréolithographie dans un élastomère poreux recouvert d’ECs. La structure est remplie d’ECM et de cellules parenchymateuses.	Configuration 3D et épaisseur Anastomose observée <i>in vitro</i> Rigidité ajustable de l’échafaudage	Dimension des capillaires non reproduite Pas de contacts directs entre cellules Elastomère synthétique biodégradable : effet de la dégradation à vérifier	[229]
	Recouvrement de membrane semi-perméable	Développement d’un endothélium et d’un épithélium sur les deux faces d’une paroi semi-perméable et étirable.	Reproduction des mouvements de contraction / étirements des alvéoles pulmonaires Reproduction de l’interface alvéole/sang Reproduction de la perméabilité de l’endothélium	Pas de contacts directs entre cellules Structure 2D Dimension des capillaires non reproduite	[101, 230]
Foie	Paroi poreuse	Des microcanaux de section $2 \times 1 \mu\text{m}$ relient une chambre de culture et un canal de perfusion reproduisant mécaniquement la perméabilité l’endothélium	Mini mécaniquement la corde hépatique du foie	Pas de ECs Un seul type cellulaire	[103, 231]
	Recouvrement de canaux creux	Réseau de canaux creux conçu par stéréolithographie dans un élastomère poreux recouvert d’ECs. La structure est remplie d’ECM et de cellules parenchymateuses.	Configuration 3D et épaisseur Anastomose observée <i>in vitro</i> Rigidité ajustable de l’échafaudage	Dimension des capillaires non reproduite Pas de contacts directs entre cellules Elastomère synthétique biodégradable : effet de la dégradation à vérifier	[229]
	Endothélialisation	Des conchues de sphéroïdes contenant des hépatocytes, des ECs et des cellules stellaires hépatiques sont formées dans un gel d’alginate et collagène et empilées.	Tri-culture au sein d’un hydrogel Protection immunitaire et assistance hépatique xénogénique lors de la greffe <i>in vitro</i>	Pré-vascularisation : pas de structure tubulaire <i>in vitro</i> Pas de perfusion <i>in vitro</i>	[232]
Rein	Recouvrement de canaux creux	Architecture d’un foie obtenu par décellarisation d’organe, conservant l’intact artère microvasculaire. Des ECs sont injectées pour recouvrir l’arbre vasculaire.	Structure de l’organe et de l’arbre vasculaire <i>in vitro</i>	Repeuplement par les cellules difficile Formation d’un endothélium difficile	[206, 207, 208, 209]
	Recouvrement de membrane semi-perméable	Développement d’un endothélium et d’un épithélium sur les deux faces d’une paroi semi-perméable.	Reproduction de l’interface sang/vein Reproduction de la perméabilité de l’endothélium Activité des tubules rénaux physiologique	Pas de contacts directs entre cellules Structure 2D Dimension des capillaires non reproduite	[233]
	Recouvrement de canaux creux	Développement d’un endothélium sur les parois d’un gel de culture de cellules épithéliales du tube proximal rénal	Plateforme de tests de médicaments Etude de la perméabilité de l’endothélium Etude du transport de molécules Contact direct entre cellules	Pas de réseau capillaire OoC seulement : non adaptable au tissu épais	[234]

Tableau 1.3 – Modèles d'organes développés et pertinence/limite des dispositifs

Organe / tissu mimé	Technique de vascularisation employée	Description du dispositif	Pertinence biologique	Limitations du modèle	Référence
Cerveau	Recouvrement de membrane semi-perméable	Deux canaux sont séparés par une membrane poreuse. La face supérieure de la membrane est recouverte d'un côté d'ECs, la face inférieure de péricytes. Le canal inférieur est recouvert de cellules gliales.	Modèle de la barrière hémato-encéphalique Tri-culture Étude de la perméabilité de l'endothélium Étude du transport de molécules Mesure de l'activité électrique	Pas de contacts directs entre cellules Structure 2D Dimension des capillaires non reproduite	[104]
	Recouvrement de canal creux	Développement d'un endothélium sur les parois d'un gel de culture d'astrocytes adjacents à un gel de culture de neurones	Tri-culture dans un environnement 3D Contacts directs entre cellules	Pas de réseau capillaires Perméabilité plus élevée qu' <i>in vivo</i> Non adaptable pour tissu épais	[235]
	Recouvrement de membrane semi-perméable	Développement d'un endothélium sur une face d'une membrane semi-perméable, l'autre face étant recouverte de péricytes et astrocytes. Cette membrane sépare un canal perfusable et une chambre de culture de neurones.	Quadri-culture dans un environnement 3D Mesure de la résistance électrique transendothéliale Étude de la perméabilité Étude du transport de molécules	Pas de contacts directs entre ECs et péricytes/astrocytes Interface 2D Dimension des capillaires non reproduite	[236]
	Auto-assemblage vasculogénèse	Formation d'un réseau capillaire par auto-assemblage d'ECs dans un gel contenant des péricytes et des astrocytes	Tri-culture Réseau capillaire physiologique Réseau perfusable Étude de la perméabilité des capillaires	Difficulté d'obtention de cellules du cerveau humain Non adaptable pour tissu épais	[187]
Peau	Recouvrement de membrane semi-perméable	Deux membranes semi-perméables sont utilisées pour séparer trois chambres microfluidiques. Une des membranes est recouverte de cellules dermales et épidermales mimant la barrière épithéliale; l'autre membrane est recouverte de cellules dermales et ECs mimant la barrière endothéliale	Tri-culture des différentes cellules de la peau Reproduit un environnement inflammatoire et un oedème	Pas de contacts directs entre cellules Structure 2D Dimension des capillaires non reproduite	[237]
Os	Recouvrement de canal creux	Un réseau d'alginate sacrificiel est bioimprimé au sein d'un gel de collagène contenant des fibroblastes. Le gel est ensuite recouvert de gélatinocytocrite. L'alginate est dégelifié et le canal creux est recouvert d'ECs.	Culture 3D perfusable Tri-culture Contacts directs entre cellules Anastomose observée après greffe <i>in vivo</i>	Réseau d'alginate difficilement imprimable pour un tissu épais Dimension des capillaires non atteinte	[238]
	Endothélialisation	Structure en PLA et GelMA endothélialisée contenant des cellules souches mésenchymateuses conçue par bioimpression par extrusion et stéréolithographie.	Développement de la structure de l'os Reproduction du canal Haversian	Pas de réseau tubulaire Réseau de capillaire non perfusable	[220]
	Auto-assemblage vasculogénèse	Formation d'un réseau capillaire par auto-assemblage d'ECs dans un gel contenant des cellules souches mésenchymateuses, des ostéoblastes et des cellules cancéreuses.	Quadri-culture Contacts directs entre cellules Modèle de l'extravasation des cellules cancéreuses au sein d'un microenvironnement osseux	Non adaptable pour tissu épais	[225]
	Recouvrement de canal creux	Développement d'un endothélium sur les parois d'un gel de culture d'ostéoblastes, de cellules souches mésenchymateuses et de cellules cancéreuses	Quadri-culture Contact direct entre les cellules Modèle de métastase osseuse avec les cellules cancéreuses du sein	Pas de capillaires Pas implémentable à grande échelle	[224]
Auto-assemblage angiogénèse	Des ECs sont cultivées dans un gel de fibrine contenant de l'hydroxyapatite	Réseau vasculaire perfusable Dimension des capillaires	Pas de co-culture Difficilement implémentable à grande échelle	[222]	

Conclusion

Afin de concevoir un tissu fonctionnel, il est nécessaire de reconstruire le microenvironnement tissulaire indispensable à la bonne fonctionnalisation des cellules. Les trois éléments essentiels composant un tissu et indispensables à sa fonction sont les cellules, la matrice extracellulaire au sein de laquelle les cellules évoluent et le réseau microvasculaire qui les approvisionne (Figure 1.28a). Cependant, chaque tissu et organe est un environnement unique très complexe : chacun de ces trois éléments diffère d’un tissu à un autre et doit être adapté selon l’organe/le tissu développé. Outre la fonction d’approvisionnement, le réseau microvasculaire joue également un rôle essentiel dans le maintien de l’homéostasie des organes.

Les domaines de l’ingénierie tissulaire et des organes-sur-puces restent des domaines récents. Jusqu’à présent, la majorité des reconstructions de tissus et d’organes cultive des cellules parenchymateuses et mésenchymateuses du tissu au sein d’une structure représentative de la matrice extracellulaire, mais n’intègre pas un réseau microvasculaire perfusant la construction et alimentant les cellules. Cette difficulté à concevoir un réseau vasculaire perfusable est actuellement la limite principale au développement de tissus épais. Zheng *et al.* schématisent le concept de développement d’organes-sur-puce (Figure 1.28b) : les organes-sur-puces sont des modélisations de l’interface, de la micro-architecture, des stimuli biochimiques et des signaux mécaniques d’un tissu [239]. Cependant, l’étape cruciale au développement de modèles épais d’organes est l’inclusion d’un réseau microvasculaire.

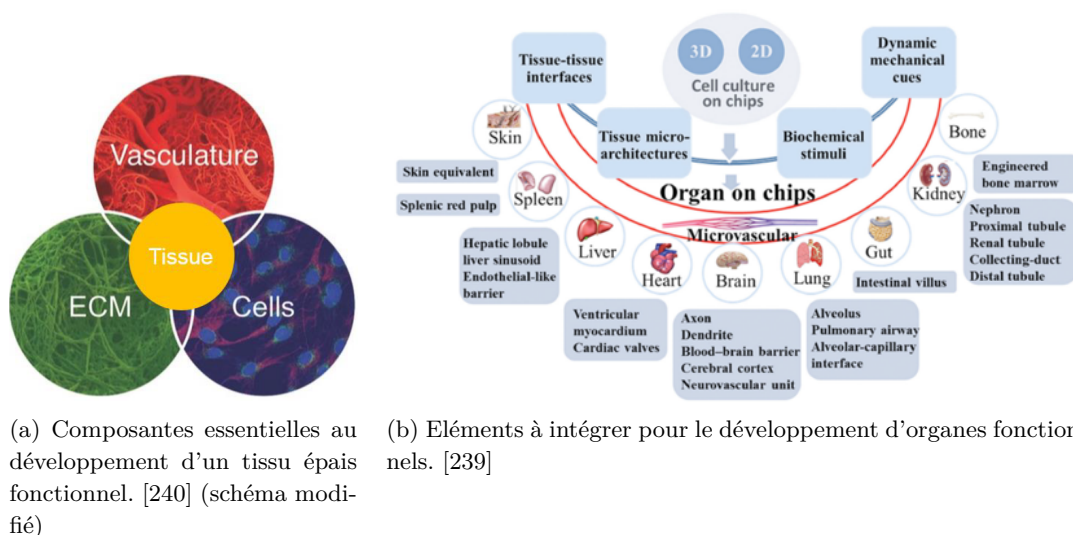


FIGURE 1.28 – Vers la conception de tissus épais fonctionnels.

De nombreuses techniques ont été développées, utilisant des approches différentes, afin de former un réseau microvasculaire perfusant les constructions tissulaires. Les techniques d’auto-assemblage recréent les étapes de différenciation des cellules en vaisseau capillaire et permettent ainsi de recréer un réseau microvasculaire physiologique, mais ces tech-

niques de vascularisation sont difficilement implémentables aux constructions tissulaires 3D. Les techniques d'endothélisation reposent sur la formation de réseau de tubes creux perfusable au sein d'un hydrogel représentatif de la matrice extracellulaire et intégrant des cellules. L'endothélisation est potentiellement intégrable au développement de tissus à grande échelle mais les difficultés de développement d'un endothélium sur la surface luminale des tubes combinées aux problèmes expérimentaux (formation de bouchons, effondrement des structures) limitent son utilisation pour la conception d'organes. Les techniques additives sont les plus prometteuses à la construction de tissus à grande échelle. Basées sur le placement successif de micro-éléments, elles permettent la formation rapide de construction épaisse et le placement de nombreuses composantes des tissus. Cependant, le coût des machines de bioimpression, la résolution et les difficultés d'utilisation avec une large gamme de biopolymères sont actuellement un frein au développement de tissus vascularisés avec cette technique. De plus, la plupart des constructions de bioimpression sont pré-vascularisées, le développement du réseau vasculaire doit alors être induit après le placement de l'ensemble des éléments du tissu.

La stratégie d'assemblage modulaire repose sur l'empilement de micro-unités tissulaires représentatives du microenvironnement *in vivo* afin de reproduire un tissu macroscopique. Cette technique permet le placement rapide de nombreux éléments du tissu et forme un milieu poreux directement perfusable, offrant peu de stress aux cellules en culture. La combinaison de l'assemblage modulaire avec l'auto-assemblage pourrait permettre le développement d'un réseau microvasculaire physiologique au sein d'une construction tissulaire épaisse.

Chapitre 2

Présentation de la stratégie de vascularisation

Notre projet vise à développer une technique générique de création d'un réseau microvasculaire perfusable au sein d'une construction tissulaire épaisse, afin d'assurer l'approvisionnement en oxygène et nutriments du tissu et sa bonne fonctionnalité.

Présentation du laboratoire et du projet

Cette thèse a été effectuée au sein du Laboratoire des Systèmes Microfluidiques et des Biotechnologies (LSMB) du CEA-LETI de Grenoble. Initialement, un des projets du laboratoire consistait à développer un traitement thérapeutique pour le diabète de type I. Le diabète de type I est dû à un déficit d'insuline. Un des traitements consiste alors à injecter des cellules sécrétrices d'insulines chez le patient. Or ces cellules implantées sont détectées par le système immunitaire du patient ce qui nécessite la prise d'un traitement immuno-suppresseur lourd pour fonctionner. La solution apportée par le projet du laboratoire vise à encapsuler les cellules implantées au sein d'un biopolymère perméable et compatible. Le biopolymère étant poreux, en ajustant la porosité, la capsule permet aux sécrétions des cellules de diffuser au travers de la membrane mais empêche les cellules immunitaires du patient de détecter la greffe. Néanmoins, malgré l'ingéniosité de cette solution, le taux de greffe des cellules encapsulées implantées était relativement faible. Une des raisons est le faible taux d'oxygénation des cellules encapsulées une fois implantées chez l'hôte. C'est ainsi qu'est née l'idée du projet de développer un réseau microvasculaire. En développant un tissu vascularisé, il serait possible de concevoir un mini-pancréas vascularisé permettant d'améliorer la connection avec le réseau vasculaire de l'hôte et ainsi augmenter l'oxygénation des cellules du tissu. De plus, la technique envisagée pourrait permettre d'être appliquée au développement d'autres tissus et organes.

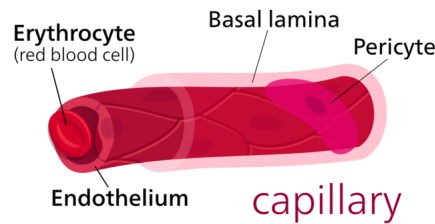


FIGURE 2.1 – Schéma de la structure d'un capillaire sanguin.
(<https://courses.lumenlearning.com/boundless-ap/chapter/arteries/>)

2.1 Les caractéristiques du réseau microvasculaire

In vivo, les tissus sont perfusés, alimentés par tout un réseau vasculaire transportant le sang qui permet de libérer l'oxygène, les nutriments, les hormones, les cellules sanguines, immunitaires, les fluides et la chaleur dans les tissus, tout en évacuant les déchets cellulaires et le dioxyde de carbone [46]. Plus précisément, les artères se subdivisent en artérioles puis en capillaires au niveau des tissus. Les échanges d'oxygènes et de nutriments s'effectuent au niveau de la paroi fine des capillaires. Afin d'accéder à l'oxygène transporté dans le sang, chaque cellule d'un organisme tissulaire est située à un maximum de $200\ \mu\text{m}$ d'un capillaire [31]. Le réseau vasculaire est ainsi dense, complexe et ramifié.

Le diamètre intérieur des capillaires varie de quelques microns ($5\ \mu\text{m}$) à une trentaine de microns. La paroi des capillaires sanguins est composée uniquement d'une couche de cellules endothéliales (Figure 2.1). Au sein de cette couche, les cellules adhèrent fermement entre elles et enveloppent la surface luminale des capillaires sanguins. Des péricytes recouvrent la surface externe de l'endothélium. Ces péricytes possèdent un rôle sur la contractibilité des capillaires et aident à rendre le capillaire mature.

Effet du cisaillement sur les cellules endothéliales

Au sein des vaisseaux sanguins, les cellules endothéliales sont soumises à des forces de cisaillement imposées par le flux sanguin. Le cisaillement est un paramètre mécanique affectant les fonctions des cellules endothéliales [241]. De nombreuses études ont été menées sur l'impact du cisaillement physiologique sur le phénotype des cellules endothéliales. Dans ces études, le terme cisaillement physiologique est très souvent utilisé afin d'indiquer un cisaillement de l'ordre de 1 à $20\ \text{dynes}/\text{cm}^2$.

Il a été montré à de nombreuses reprises qu'une force de cisaillement physiologique entraîne un allongement des cellules endothéliales et une orientation dans le sens du flux [78, 242, 81, 243, 244, 82]. Le cisaillement physiologique tend à inhiber la prolifération des cellules endothéliales. Cette inhibition de la prolifération réduit ainsi le renouvellement des cellules et améliore la perméabilité de l'endothélium [78, 77, 245, 246]. Le cisaillement favorise également la migration des cellules [247, 248], renforce les interactions entre les cellules endothéliales et la matrice extracellulaire [249] et exerce un effet suppresseur de l'apoptose qui contribue à l'intégrité cellulaire [250, 251, 252].

Baeyens *et al.* détaillent les mécanismes moléculaires activés par le cisaillement physiologique [253, 254]. Galie *et al.* montrent qu'un cisaillement supérieure à 10 dyn/cm^2 favorise l'angiogenèse. Ueda *et al.* ont montré que des cellules endothéliales BPMECs soumises à un flux laminaire de 3 dyn/cm^2 envahissent la matrice de collagène sur laquelle elles reposent [255]. La même observation est montrée par Kang *et al.* sur des cellules endothéliales HUVECs pour un flux laminaire de 5 dyn/cm^2 [256].

Pour notre application, nous souhaitons développer un réseau de capillaires sanguins perfusé par un flux physiologique. Nous cherchons ainsi à former une couche de cellules endothéliales enveloppant une structure tubulaire creuse dont le diamètre est compris entre 5 & $30 \mu\text{m}$. Le flux physiologique est utilisé afin d'induire l'alignement des cellules endothéliales dans la direction du flux et influencer la vascularisation de notre construction [257].

2.2 La technique de vascularisation utilisée

La technique que nous souhaitons développer vise à recouvrir de cellules endothéliales les parois d'une architecture poreuse et d'imposer un cisaillement physiologique à la surface des cellules endothéliales afin d'induire leur orientation et leur arrangement au sein des pores de la structure.

La structure poreuse est conçue par empilement de microsphères. Les empilements de sphères forment des milieux poreux ouverts au travers desquels un liquide peut circuler. Au sein d'une telle structure, la taille des pores est variable et la dimension caractéristique des pores peut être ajustée selon la dimension des microsphères empilées. En recouvrant préalablement les microsphères d'une couche de cellules endothéliales, puis en appliquant un flux spécifique imposant une force de cisaillement physiologique à la surface des microsphères, les cellules endothéliales s'aligneront le long des lignes de courant et devraient s'auto-arranger afin de former la structure des capillaires.

Le principe de la technique est schématisé Figure 2.2. L'objectif est de produire des microbilles à partir d'un biopolymère reproduisant la matrice extracellulaire. Des cellules du tissu d'intérêt peuvent être incluses dans ces microbilles mimant un micro-environnement tissulaire. Des cellules endothéliales sont ensuite cultivées à la surface de ces microsphères afin de développer une couche homogène de cellules mimant l'endothélium. Chaque unité constituée de cellules tissulaires, de biopolymère et d'un endothélium est alors chargée dans une chambre microfluidique adaptée afin de former un empilement compact de microsphères. Un flux est appliqué dans les pores formés par l'empilement permettant à la fois d'alimenter les cellules encapsulées, mais également d'induire une force de cisaillement au niveau de la paroi des microsphères, donc sur les cellules endothéliales qui les recouvrent. Par application d'un flux contrôlé et spécifique, on peut appliquer des forces de cisaillement de l'ordre physiologique. Ainsi, les cellules endothéliales s'orienteront dans

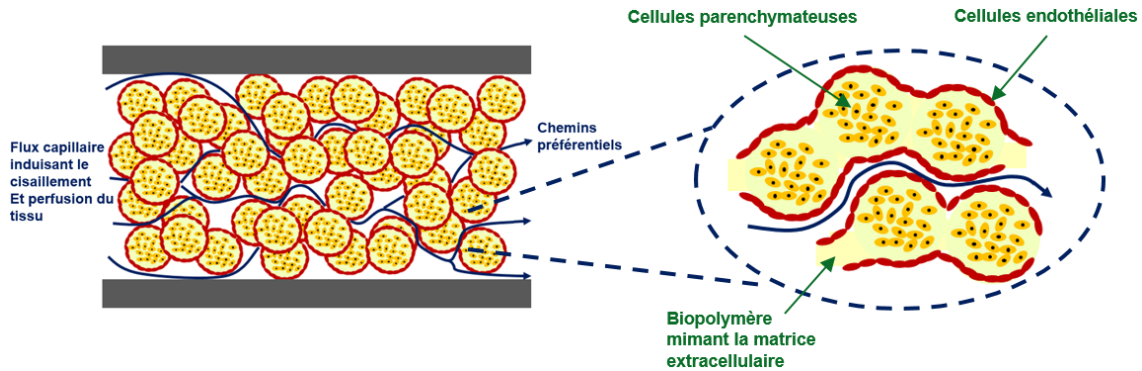


FIGURE 2.2 – Schéma explicatif de la technique développée durant le projet : empilement de modules tissulaires endothélialisés et application d'un flux afin d'induire la formation d'un réseau microvasculaire au sein de l'espace interstitiel.

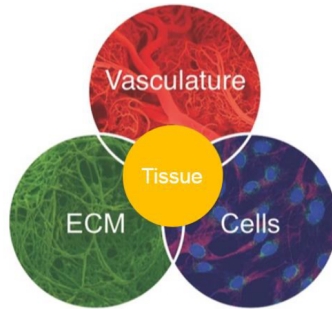


FIGURE 2.3 – Schéma représentatif des 3 composantes essentielles d'un tissu biologique. Ce schéma a été modifié à partir de celui de la publication de Kolesky et al. [61]

le sens du flux et s'auto-arrangeront pour former une couche endothéliale entre les micro-billes. En maximisant l'empilement des sphères, l'espace inter-billes dans lequel le fluide circule s'apparente à un tube creux dont les parois seront totalement recouvertes d'une couche d'endothélium. Ainsi, on obtiendrait une culture tissulaire épaisse parsemée de pores endothélialisés et perfusée de milieu de culture.

Un tel système intègre au sein d'une chambre microfluidique les trois composants essentiels d'un tissu : les cellules, la matrice extracellulaire et le réseau microvasculaire (Figure 2.3). La matrice extracellulaire est représentée par le biopolymère formant les microsphères, les cellules du tissu d'intérêt sont encapsulées au sein du biopolymère et la structure est perfusée d'un réseau de tubes creux recouverts de cellules endothéliales.

Les modules tissulaires

Les cellules typiques de l'organe d'intérêt peuvent être encapsulées dans les microsphères produites à partir d'un biopolymère représentatif de la matrice extracellulaire. Le biopolymère peut être adapté à l'application et aux cellules encapsulées. Plusieurs biopolymères peuvent être utilisés pour produire les microsphères parmi de nombreux hydrogels, naturels

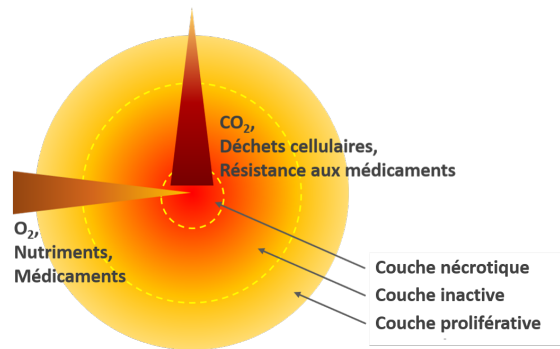


FIGURE 2.4 – Schéma des gradients de molécules mis en jeu dans les sphéroïdes.

ou synthétiques, utilisés en ingénierie tissulaire. Les microsphères sont ensuite recouvertes de cellules endothéliales pouvant provenir soit de l'organe d'intérêt ou bien de cellules souches progénitrices endothéliales. Afin de faciliter l'adhérence des cellules endothéliales, le biopolymère utilisé peut être fonctionnalisé, par exemple par greffage de peptide. Une fois l'accroche réalisée, les cellules endothéliales sont ensuite cultivées par méthode classique (statique) jusqu'à recouvrir la totalité de la surface. Les sphères sont alors prêtes à l'injection dans la carte microfluidique.

Au sein de l'empilement, du milieu de culture est perfusé et circule autour de chaque microsphère. Ainsi, en considérant la loi de Fick de diffusion de l'oxygène, il est nécessaire de produire des microsphères dont le diamètre n'excède pas $400\ \mu\text{m}$ afin de permettre la diffusion de l'oxygène au sein de la totalité de la microsphère [12]. Des diamètres de sphères plus importants causent l'apparition d'une couche nécrotique au niveau du coeur de la sphère (Figure 2.4).

La carte microfluidique

Les microbilles endothélialisées sont empilées dans une chambre usinée au sein d'une carte microfluidique. Cette chambre est fabriquée avec des éléments standards de culture cellulaire tels que le plastique, le verre, le silicium ou autre matériau compatible avec des applications biomédicales. Il est intéressant d'utiliser un matériau transparent afin de pouvoir observer la formation des structures au travers de la carte microfluidique. La puce microfluidique doit être équipée d'un filtre, de vannes afin de perfuser le système tout en retenant les microsphères au niveau de la chambre. Un capot amovible peut également être intégré de manière à récupérer les constructions tissulaires développées. La chambre microfluidique est ensuite connectée à un système de perfusion oxygéné permettant l'alimentation des cellules en continu.

La géométrie de la chambre doit être modulée suivant l'application. Par exemple, il est possible d'imaginer concevoir une chambre microfluidique en forme d'entonnoir, à l'image de ce qui est réalisée dans les dispositifs de Moya *et al.* ou Kim *et al.*, afin de développer une anastomose entre le réseau vasculaire en formation et des cellules endothéliales tapissant

les canaux de perfusion [61, 59].

L’empilement de microsphères

De par les propriétés des empilement de sphères, il est possible de moduler et contrôler l’espacement inter-billes. La dimension caractéristique des pores développés est dépendante du diamètre des microsphères et peut varier de quelques dizaines de microns à la centaine de microns. Un empilement de sphères de dimensions hétérogènes contrôlées peut notamment permettre de réduire la dimension caractéristique des pores. En adaptant le diamètre des microsphères, il est possible de former des pores dont les dimensions coïncident avec celles des capillaires.

Il est également possible de former des couches successives d’empilement de sphères de différentes tailles. Ainsi, en empilant des couches de microsphères de différentes tailles, il est possible de créer des porosités plus larges en entrée/sortie de la chambre afin de favoriser une anastomose des capillaires.

La perfusion

Une fois l’empilement de microsphères créé, du milieu de culture oxygéné est perfusé. Le flux de milieu va générer des chemins préférentiels dans les porosités de l’empilement et des zones avec des cisaillements variables. La perfusion est contrôlée afin d’appliquer une force de cisaillement physiologique qui influence la réorganisation des cellules endothéliales en capillaires sanguins le long des parois de l’empilement. Des facteurs de croissance peuvent être utilisés en complément afin de promouvoir la formation du réseau sanguin, soit par co-culture de fibroblastes, ou alors par perfusion de facteurs de croissance endothéliaux. Cependant, l’effet de ces facteurs sur la structure du réseau capillaire doit être étudié.

2.3 Avantages de la technique d’assemblage modulaire

Notre technique empile des micro-unités sphériques au sein d’une chambre adaptée. Par rapport aux techniques de vascularisation *in vitro* présentées dans l’état de l’art, notre technique se classe dans la catégorie de l’assemblage modulaire.

Comme présentée dans la section 1.3.4, la technique d’assemblage modulaire présente plusieurs avantages par rapport aux autres techniques de vascularisation *in vitro*. Tout d’abord, à l’image des techniques d’endothélisation de surfaces, le recouvrement des microsphères est rapide et s’effectue en 1-2 jours. Suite à l’endothélisation, la construction de l’architecture d’empilement de sphères est rapide et est développée par simple injection et accumulation des microsphères au sein d’une chambre adaptée. Cette rapidité de conception rend compatible son utilisation pour la formation de constructions épaisses et aux dimensions physiologiques.

Un autre avantage de ce système réside dans le fait que le réseau microvasculaire se développe simultanément à la culture des cellules encapsulées au sein de la construction tis-

sulaire. En comparaison, la technique d'auto-assemblage des cellules endothéliales permet de développer des capillaires physiologiques dont le diamètre est compris généralement entre 10 et 50 μm . Cependant, le temps de formation d'un réseau microvasculaire par cette méthode est long et nécessite généralement plus d'une semaine. Durant ce temps, les cellules de culture potentiellement incluses dans l'hydrogel ne sont pas alimentées, entraînant la nécrose du tissu. C'est pourquoi les techniques de vascularisation par angiogenèse ou vasculogenèse ne sont généralement pas utilisées afin de vasculariser une construction tissulaire épaisse, hors cas de la perfusion de tumeurs ou cellules tumorales. Dans notre cas, comme l'endothélium est préformé avant l'injection par culture des cellules endothéliales sur la surface des sphères, le processus de développement par empilement de micromodules est rapide et permet une perfusion simultanée au développement du réseau microvasculaire. L'unique moment où les cellules ne sont pas placées dans des conditions physiologiques est lors de la conception des micromodules. Néanmoins les techniques d'encapsulation cellulaire développées de nos jours sont rapides et génèrent peu de stress aux cellules.

La technique de bioimpression est désignée comme la technique la plus prometteuse pour le développement de tissus et d'organes physiologiques. Cependant, les conceptions de réseau vasculaire par bioimpression atteignent difficilement des résolutions inférieures à la centaine de microns. La bio-impression assistée par laser permet la déposition précise des cellules à des résolutions proches de la dizaine de microns, mais le processus de dépôt des cellules doit ensuite être couplé avec les techniques d'auto-assemblage afin de favoriser l'organisation des cellules en un réseau capillaire. Cette technique est prometteuse mais très coûteuses à l'heure actuelle. De plus des problèmes d'effondrement des structures empêchent actuellement le développement de tissus épais. En comparant notre technique à la bioimpression, l'assemblage de modules sphériques permet d'atteindre une dimension caractéristique de pores de 50 μm , en adaptant la taille des modules. Cette dimension peut même être diminuée par l'accumulation de sphères hétérogènes. Une telle résolution n'a pas encore été atteinte pour des vaisseaux conçus par les techniques de bio-impression, par exemple. De plus, l'accumulation des microsphères au sein d'un moule adapté permet l'assemblage rapide en un tissu épais à l'image des réalisations de Khan *et al.* ou encore Matsunaga *et al.* [174, 258].

Ainsi, la technique d'assemblage modulaire est un procédé de développement de tissus larges rapide qui apparaît, à l'heure actuelle, le plus adapté pour la conception de tissus épais intégrant un réseau tubulaire vascularisé perfusable. Peu de développements tissulaires par assemblage modulaire ont été réalisés à ce jour. Agarwal *et al.* ont combiné la méthode d'assemblage modulaire avec la technique d'auto-assemblage des cellules endothéliales afin de développer un modèle de cancer-sur-puce [177]. Ils ont empilé des microsphères encapsulant des sphéroïdes tumorales au sein d'un gel de collagène contenant des cellules endothéliales. Les microsphères permettent d'espacer régulièrement les sphéroïdes et la vascularisation est favorisée par les cellules tumorales qui secrètent de cytokines promouvant la vasculogenèse et l'angiogenèse. La publication de Khan *et al.*

illustre le potentiel de la technique pour le développement de tissus ou d'organes épais [174]. Son équipe empile des cylindres (2.8 mm de longueur et 760 μm de diamètre) encapsulant des cardiomyocytes au sein d'un moule basé sur le foie d'un rat. Matsunaga *et al.* ont également empilé des modules au sein d'un moule adapté afin de construire un tissu épais [258]. Des microsphères de collagène recouvertes de cellules endothéliales sont empilées dans un moule et les cellules sont alimentées par diffusion du milieu au travers de l'espace interstitiel de l'empilement.

La publication de Khan *et al.* et celle de Matsunaga *et al.* sont des exemples de construction tissulaire épaisse rapide. Néanmoins, ces empilements sont perfusés par des flux faibles et les cellules bouchent rapidement les espaces interstitiels entre les modules. Ces configurations n'ont pas été utilisées dans le but de développer un réseau microvasculaire. Dans notre cas, nous pensons empêcher la formation de bouchons par application d'un écoulement physiologique entraînant l'allongement des cellules endothéliales dans le sens du flux.

Conclusion

En résumé, cette technique de vascularisation nécessite trois composantes : des sphères, des cellules endothéliales et un flux contrôlé. La simplicité des outils de développement de ce réseau microvasculaire offre des possibilités d'adaptabilité et diversification du système, que nous discuterons dans la conclusion de ce manuscrit de thèse. Cette technique peut être implémentée dans de nombreuses constructions et modèles d'organe(s)-sur-puce. La stratégie employée présente l'avantage principal de cultiver les cellules en parallèle de la formation du réseau vasculaire.

Le but de cette thèse est de montrer qu'un réseau microvasculaire perfusant un empilement de sphères épais peut être développé avec cette technique. Les chapitres qui suivent présentent les trois étapes nécessaires à la réalisation de ce projet :

- Etape 1 - conception des microenvironnements tissulaires
Deux techniques d'encapsulation sont développées afin de produire des microsphères de biopolymère destinées à former la structure d'empilement de sphères.
- Etape 2 - écoulement au sein d'un empilement de sphères
La structure des empilements de sphères est étudiée et l'écoulement au sein d'une telle structure est caractérisé afin de paramétrer le débit à imposer au système microfluidique et d'induire un cisaillement physiologique de l'ordre de 1 à 10 dynes/cm² à la surface des cellules.
- Etape 3 - développement du réseau de capillaires
Des microsphères sont produites, recouvertes de cellules endothéliales et empilées au sein d'une chambre microfluidique. L'empilement est perfusé durant plusieurs jours de sorte à imposer un cisaillement physiologique. La structure est ensuite étudiée afin de caractériser la présence d'un réseau de capillaires sanguins perfusant la

construction tissulaire.

Chapitre 3

Matériels & Méthodes

Ce chapitre décrit les méthodes expérimentales pratiquées et les matériels utilisés dans le but final de concevoir un réseau de capillaires sanguins perfusables au sein d'une puce microfluidique.

3.1 Génération des microbilles

Deux systèmes ont été utilisés afin de produire des microbilles de biopolymères. Le premier système utilise la technologie microfluidique appelée MFFD (pour MicroFlow Focusing Device) déjà appliquée dans le laboratoire. Le second système, appelé Centricaps, a été développé durant la thèse.

3.1.1 Système microfluidique

3.1.1.1 Géométrie microfluidique pour la production de microbilles

La plateforme CellEnc⁶ est un système de production de microbilles élaboré dans le laboratoire et déjà présent au commencement de la thèse. Les cartes microfluidiques conçues durant la thèse pour la production de microbilles de biopolymères s'inspirent de celles déjà réalisées avec cette plateforme. Plusieurs géométries ont été réalisées dépendant du biopolymère utilisé. Chaque carte intègre néanmoins deux modules successifs : un module de génération de gouttes et un module de pré-gélification des structures.

Module de génération de gouttes

La technique de génération utilisée dans nos systèmes microfluidiques est la technologie MFFD (pour MicroFlow Focusing Devices). Elle consiste en le cisaillement d'un fluide par un second fluide non miscible. Le liquide cisailé est appelé phase dispersée et le liquide cisailant est appelé phase continue. Le premier dispositif utilisant cette technologie a été présenté par Anna *et al.* [259]. Plusieurs géométries de MFFD peuvent être développées. Dans le cadre de la thèse, nous utilisons la géométrie semblable à celle présentée par Tan *et al.* [260] (Figure 3.1a - Module de génération). Dans cette configuration, la phase dispersée

est le biopolymère composant les futurs microsphères et s'écoule dans un canal central. La phase continue s'écoule dans deux canaux microfluidiques perpendiculaires. Elle engendre le cisaillement du biopolymère. La jonction entre ces deux phases, où sont formées les gouttes, est suivie d'une chambre triangulaire permettant de focaliser le cisaillement et débouchant sur le canal central. Le liquide non miscible utilisé est de l'huile biologique. Nous avons utilisé différentes huiles que nous présentons plus loin. La taille des gouttes produites dépend de la pression appliquée en amont des canaux, de la viscosité des fluides et surtout des dimensions de l'entrée de la chambre triangulaire. Les canaux conçus sont à section rectangulaire et leur dimension est indiquée Figure 3.1b. Pour la géométrie présentée, l'entrée du motif triangulaire de section $200 \times 200 \mu\text{m}^2$ permet d'obtenir des billes de diamètre compris entre 200 et 400 μm .

Module de pré-gélification des gouttes

Les microsphères conçues doivent être récupérées dans un bain aqueux et le biopolymère doit être gélifié. L'implémentation d'une étape de pré-gélification est nécessaire afin d'initier la gélification des gouttes au sein du microsystème et de conserver la structure sphérique lors du transfert de la phase continue au bain gélifiant aqueux. Le module de pré-gélification dépend des propriétés du biopolymère.

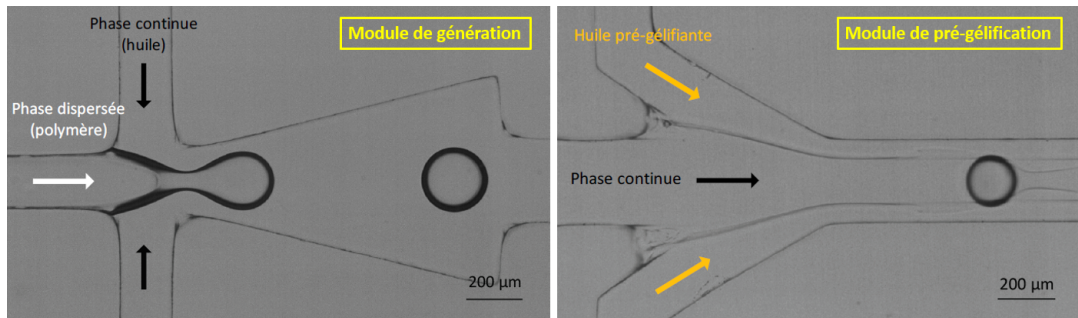
L'alginate gélifie par diffusion d'ions bivalents. Ainsi, la pré-gélification est initiée dans la carte microfluidique par intégration d'ions calciums Ca^{2+} dans l'huile. L'huile pré-gélifiante circule dans deux canaux microfluidiques qui se ramifient avec le canal de transport des gouttes (Figure 3.1a - Module de pré-gélification).

Dans le cas du collagène, la gélification est provoquée par chauffage de la solution. Le module de pré-gélification est réalisé par conception d'un serpentin (Figure 3.1c) et chauffage local, avec une résistance chauffante, du liquide transportant les microbilles. La gélification du collagène par chauffage de la solution dure en moyenne une quinzaine de minutes. Comme l'écoulement du fluide transportant les microbilles possède une vitesse proche de 1.5 mm/s, le serpentin est conçu avec une longueur de 1,6 mètre afin de laisser le temps au collagène de gélifier.

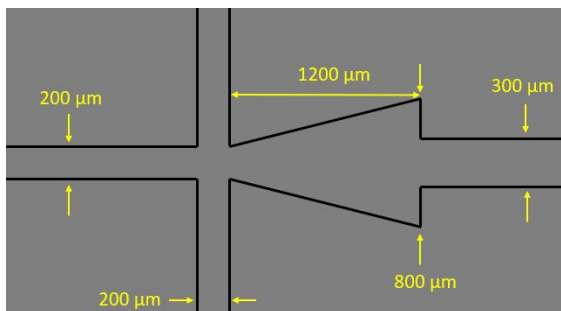
3.1.1.2 Fabrication des cartes microfluidiques

Choix du matériau

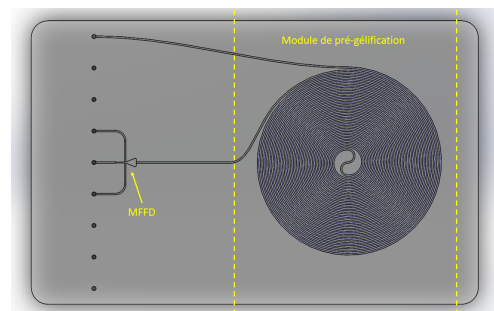
Plusieurs matériaux sont utilisés dans la littérature pour la conception de dispositif microfluidique de manipulation de composés biologiques. Chaque matériau présente des avantages et des inconvénients [261]. Berthier *et al.* effectuent une comparaison des forces et faiblesses de chacun des matériaux couramment utilisés pour la fabrication de systèmes de culture microfluidiques (Figure 3.2) [262]. Les matériaux thermoplastiques comme le COC (pour Cyclic Olefin Copolymer), le COP (pour Cyclic Olefin Polymer) ou le PMMA (pour Poly(methylmethacrylate)) sont avantageux en termes de coûts, de compatibilité biologique, de transparence dans le visible et d'industrialisation. C'est pourquoi notre laboratoire s'est spécialisé dans la conception de cartes thermoplastiques.



(a) Module de génération de microsphères et Module de pré-gélification des microsphères d'alginate



(b) Dimension des canaux microfluidiques



(c) Géométrie de la carte microfluidique de production de billes de collagène

FIGURE 3.1 – Système microfluidique MFFD de génération de microsphères

Les cartes microfluidiques utilisées durant cette thèse sont conçues dans du COC [263]. Contrairement au PDMS, ce matériau est, dans les conditions d'utilisations, imperméable aux gaz et présente l'avantage de résister aux solvants comme l'acétone, le méthanol et l'isopropanol. Il possède des propriétés optiques intéressantes : il est transparent à la lumière pour des longueurs d'ondes supérieures à 400 nm et est faiblement autofluorescent. De plus, il est compatible avec la stérilisation aux rayons gamma ou à l'autoclave permettant son utilisation pour des applications médicales. Le COC est d'ailleurs approuvé par la FDA et est souvent utilisé dans le domaine des dispositifs médicaux.

Le COC est disponible sous forme de granules destinées à l'injection, mais notre laboratoire s'approvisionne directement auprès de l'entreprise TOPAS afin d'obtenir des plaques de ce matériau. Plusieurs types de COC, possédant des températures de transition vitreuse différentes, existent : TOPAS-8007 ($T_v = 78^\circ\text{C}$), TOPAS-5013 ($T_v = 134^\circ\text{C}$), TOPAS-6015 ($T_v = 160^\circ\text{C}$) et TOPAS-6017 ($T_v = 130^\circ\text{C}$). Comme la technique d'usinage provoque un échauffement local du matériau, il est nécessaire de choisir un modèle résistant à la température, c'est pourquoi le COC préférentiellement utilisé par notre laboratoire est le grade 5013.

Conception et usinage

Les cartes microfluidiques sont au format carte de crédit (85,6 mm x 54 mm). Les

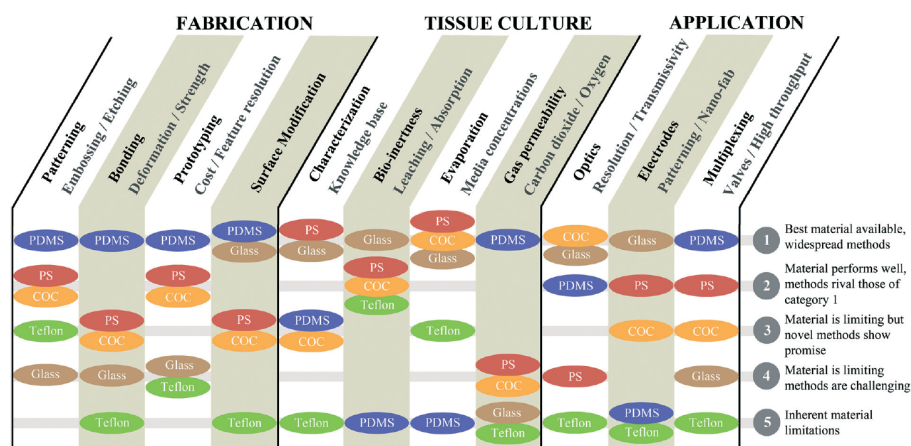


FIGURE 3.2 – Comparaison des forces et faiblesses des matériaux classiques utilisés pour la fabrication de systèmes de culture microfluidiques. [262]

canaux microfluidiques sont fabriqués par usinage de plaques de COC d'épaisseurs allant de 10 mm à 50 μm . L'architecture microfluidique des cartes est dessinée en 3 dimensions à l'aide du logiciel de conception assistée par ordinateur (CAO) Solidworks. La technique d'usinage consiste en l'enlèvement de matière au sein d'un bloc par fraisage. L'usinage est réalisé par l'équipement Datron-M7HP (Figure 3.3) et est piloté par le logiciel CAO. Cet équipement permet d'usiner les cartes microfluidiques dans des conditions propres car l'usinage s'effectue à l'éthanol plutôt qu'à l'huile de coupe ce qui évite la contamination des échantillons. Suite à l'usinage, les canaux sont refermés grâce à un scellement thermique entre la plaque usinée et une plaque de COC pleine. Les deux plaques sont alignées et positionnées dans une presse à 127°C, température de déformation sous charge (DTUL) du COC, pendant 80 min. Les canaux creusés peuvent également traverser la totalité du bloc plastique; dans ce cas, le collage thermoplastique doit être réalisé sur chaque face afin d'établir l'étanchéité des canaux microfluidiques. Des puits d'entrées/sorties sont percés avant collage au niveau des extrémités des canaux microfluidiques afin de réaliser la connectique fluide entre les tubes d'injection/récupération des liquides et la carte.

Traitement de surface

Afin de favoriser le détachement des gouttes de biopolymère lors de la production de microbilles, il est nécessaire que la phase dispersée ne mouille pas les parois. Pour éviter cela, la surface des canaux est rendue hydrophobe. La mouillabilité peut être modifiée par fonctionnalisation de surface. La surface des canaux est fonctionnalisée par silanisation : une fine couche d'un silane, dans notre cas le FDTS (pour perFluoroDecylTrichloroSilane) (AB111155, ABCR), est déposée sur les parois du canal en utilisant la technique MVP (Molecular Vapor Deposition) à pression constante. Ce dépôt de silane rend la surface hydrophobe (angle de contact COC/eau de 128°) et résiste aux solvants tels que l'éthanol.



FIGURE 3.3 – Equipement d’usinage Datron M7HP

3.1.1.3 Solutions utilisées

Phase dispersée : les biopolymères

La phase dispersée contient le biopolymère d’encapsulation. Deux biopolymères ont été utilisés durant cette thèse.

- o **L’alginate** ultra-pur Pronova™ SLM100 disponible commercialement chez Nova-Matrix. Ce polymère est reçu lyophilisé et conditionné dans un flacon stérile. La solution est préparée en solubilisant l’alginate dans une solution aqueuse de NaCl (Sigma-Aldrich, S9625) à 150 mM et HEPES (Gibco®, 15630-056) à 10 mM ajustée à pH=7,4 et préalablement filtrée par passage au travers d’un filtre 0,22 μm (Millipore, Millex®-GV Hydrophilic PDVF). La solution est agitée une nuit à température ambiante afin de solubiliser totalement le biopolymère. La solution mère est préparée à la concentration massique de 4%.
- o **Le collagène** de type I (Corning®, 354249) est la solution utilisée pour la production de microsphères de collagène. Cette solution est reçue liquide à 4°C et pH acide à une concentration comprise entre 8 et 11 mg/mL, dépendant du lot. La solution gélifie par neutralisation et chauffage à 37°C. Dans une solution neutralisée à froid, le collagène n’est pas stable et les molécules de collagène forment des agglomérats au bout d’un certain temps. Ainsi, il est nécessaire d’utiliser la solution une à deux heures après la neutralisation, afin d’éviter la dénaturation du collagène. Plus de détails seront présentés section 4.1.2. De plus, afin d’éviter toute gélification en amont de l’expérience, chaque solution utilisée est conservée à 4°C. De même, les cônes de pipettes sont préalablement stockés au congélateur afin d’éviter un réchauffement de la solution. La solution mère de collagène est préparée en ajoutant 1/10 du volume total de dPBS 10X (D1408, Sigma-Aldrich), en ajustant le pH de la solution à 7,4 avec une solution de NaOH, et en diluant avec de l’eau DI pour ajuster la concentration. Une solution de de collagène PureCol® provenant de bovin a également été utilisée afin de reproduire les conditions d’expériences d’une publication (Advanced BioMatrix, 5074-G).

Les biopolymères étant visqueux, ils sont manipulés avec une pipette à déplacement positif Pos-D (Mettler Toledo) adaptée aux fluides visqueux.

Nous verrons que des mélanges d'alginate et de collagène ont été utilisés durant les travaux. Soit x et y la concentration finale en alginate et collagène du mélange, respectivement, on utilise la notation : SLM x -Col y afin d'indiquer la composition du mélange.

Phase continue : les huiles

L'huile est utilisée en tant que phase continue cisillant le biopolymère. Les huiles naturelles ont été privilégiées pour leur biocompatibilité provenant de différentes sources :

- o L'huile principalement utilisée pour la production de microsphères d'alginate est l'huile de soja (Super-refined soybean oil, USP EP LQ MH, Croda).
- o L'huile minérale pure (Acros Organics™, 8042-47-5) est utilisée pour la production de microsphères de collagène.
- o L'huile de maïs (Acros Organics™, 8001-30-7) a également permis de développer une autre expérience décrite dans une publication.

Du tensioactif a parfois été ajouté afin de limiter la coalescence des microbilles de collagène avant leur gélification : le Span™80 (Span80™V Pharma, Croda). Du Pluronic F127 (Sigma-Aldrich[®], P2443) a également servi de surfactant en phase aqueuse pour limiter la coalescence des microbilles.

Phase pré-gélifiante : insertion de cristaux d'acétate de calcium dans l'huile

L'alginate est gélifié par diffusion d'ions Ca^{2+} . Le processus de gélification est expliqué section 4.2.3.1. Dans le cas de la formation de microsphères d'alginate, la phase pré-gélifiante est développée par intégration de cristaux de calcium dans l'huile. Des cristaux d'acétate de calcium (Calcium Acetate FCC/poudre, Maccro Organques Inc., 08-156) sont ajoutés à la solution d'huile de soja, à la concentration massique finale de 2%. La taille des cristaux de calcium influençant la forme des microsphères produites et l'état des surfaces, il est nécessaire d'utiliser des cristaux les plus petits possible. C'est pourquoi un broyage colloïdal est réalisé afin de réduire la taille des cristaux.

Protocole de broyage

- o 30 g de poudre d'acétate de calcium est séchée une nuit dans une étuve à 100°C. Il a été observé que cette étape de séchage améliorait l'efficacité du broyage.
- o La poudre séchée est mélangée dans 60 g d'huile de soja afin d'obtenir une concentration massique de 33% en acétate de calcium.
- o L'huile pré-gélifiante est placée dans un bol de broyage de 50mL en alumine (RETSC, 01-462-0153) contenant des billes de zirconium de 2 mm (Verder Scientific, 05.368.0089) (Figure 3.4-1 & 3.4-2).
- o Le bol est refermé et placé à l'étuve à 60°C une nuit entière afin de réduire la viscosité de la solution et améliorer l'efficacité du broyage.

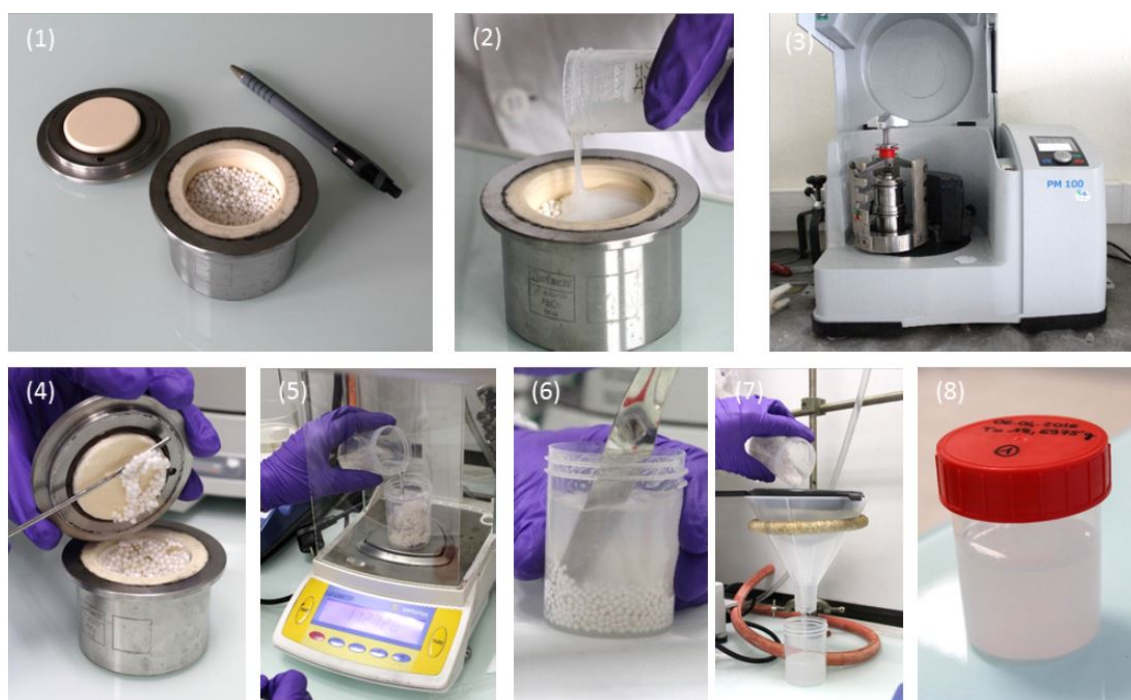


FIGURE 3.4 – Etapes de préparation de l’huile pré-gélifiante par broyage colloïdale

- o Le broyage est réalisé durant 2 heures alternant des cycles de broyage de 5 minutes à 500 rpm et des cycles de repos de 1 minute (Figure 3.4-3).
- o La solution d’huile pré-gélifiante et les billes de zirconium sont transférées dans un contenant en plastique et de l’huile de soja pure est ajoutée afin de d’obtenir une concentration en acétate de calcium à 9% (Figure 3.4-4, 3.4-5 & 3.4-6).
- o L’ensemble est ensuite filtré pour retirer les billes de zirconium (Figure 3.4-7).
- o L’huile pré-gélifiante est stockée à la concentration de 9% (Figure 3.4-8), et la solution est diluée avant chaque expérience à la concentration de 2%. On note la solution finale : HS+2%AC.

Solutions gélifiantes

Les microsphères d’alginate sont pré-gélifiées dans le canal microfluidique par l’huile HS+2%AC. Le canal transportant les microsphères débouchent ensuite dans un récipient contenant le bain de gélification aqueux. Les sphères contenues dans l’huile sédimentent alors de la phase huile vers la phase aqueuse et complètent leur gélification. Le bain de gélification est fortement concentré en calcium afin de compléter la gélification de l’alginate. Les sphères d’alginate sont ensuite transférées du bain gélification vers la solution de conservation que l’on appelle sérum physiologique, contenant également du calcium afin de maintenir la gélification.

Le bain de calcium et le sérum physiologique sont tous les deux composés de NaCl (Sigma-Aldrich, S9625), CaCl₂ (Sigma-Aldrich, C1016) et HEPES (Gibco®, 15630-056).

Les concentrations sont indiquées Table 3.1.

Tableau 3.1 – Composition des solutions de gélification d’alginate

	NaCl	CaCl ₂	HEPES
Bain de Calcium	70 mM	30 mM	25 mM
Sérum physiologique	150 mM	2 mM	10 mM

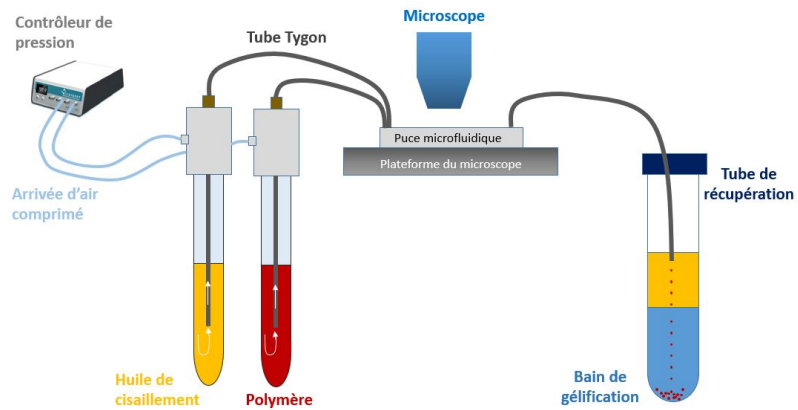
Le pH des solutions est ajusté à 7,4 par ajout de NaOH et est contrôlé avec un pHmètre (MeterLab[®], PHM220). La stérilité est assurée par filtration au travers un filtre 0,22 μm .

3.1.1.4 Banc expérimental

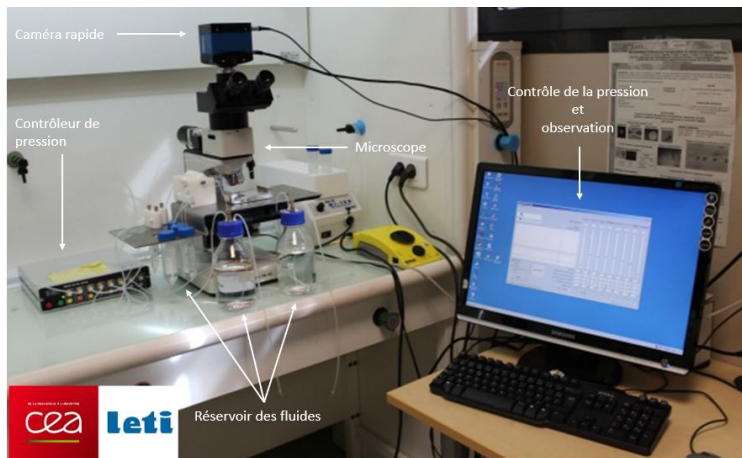
Le montage expérimental de production de microbilles est montré Figure 3.5. Le banc expérimental utilisé pour produire des microsphères est constitué de (Figure 3.5a & 3.5b) :

- o **Un contrôleur en pression** relié aux réservoirs de fluide eux-mêmes reliés à la carte microfluidique permettant d’actionner les fluides au sein de la puce microfluidique. Un contrôleur de pression (Fluigent, MFCS-8C, 0-1 bar) comportant 8 voies et délivrant entre 0 et 1 bar est utilisé. Un logiciel fourni avec le contrôleur de pression permet de commander avec un ordinateur la pression appliquée à chacune des voies. Le contrôleur de pression est relié aux réservoirs contenant les fluides à actionner, et chaque réservoir est relié à la carte microfluidique par un tube. Une pression est délivrée dans le réservoir par le contrôleur en pression et le fluide est poussé dans la connectique microfluidique vers la carte (Figure 3.5a).
- o **Flowpad[®]**. Le système Flowpad[®] est un support pour les cartes microfluidiques produites au sein du laboratoire qui assure l’étanchéité des connectiques microfluidiques reliées à la carte. Il est composé d’une partie fixe qui maintient la carte en place et d’une partie amovible qui intègre les connectiques fluidiques. Des vis serrent la carte sur le support garantissant l’étanchéité des connexions.
- o **Des connectiques microfluidiques** connectant les récipients d’injection à la carte microfluidique et le liquide transportant les microsphères au bain de récupération. Des tubes Tygon[®] (S-54-HL) de diamètre interne 510 μm et des tubes PFA (Cluzeau Info Lab[®], 1507L) de diamètre interne 1,57 mm sont utilisés.
- o **Un microscope et une caméra**. La puce microfluidique est placée sous un microscope et une caméra permet le suivi en tant réel de la production de microsphères sur un ordinateur. L’observation est permise par un microscope Olympus PROVIS AX70 muni d’un adaptateur Olympus U-CMAD-2, d’une lampe et d’une caméra ultra-rapide Mikrotron (GmbH, MotionBlitz Eosens), au travers d’objectifs Olympus 5x et 10x.

Pour la production de microbilles de collagène, l’ensemble des fluides ainsi que la carte microfluidique sont placés dans une chambre froide portative à 4°C afin de prévenir la



(a) Schéma du système microfluidique



(b) Banc expérimental de production de microsphères d'alginate



(c) Banc expérimental de production de billes de collagène

FIGURE 3.5 – Système microfluidique MFFD de génération de microsphères

gélification du collagène et le maintenir liquide (Figure 3.5c). Une vitre a été placée sur la face supérieure de la glacière afin de permettre l’observation en tant réel de la formation des gouttes de collagène. Le tube de sortie de récupération des billes est relié à un contenant de récupération placé sur une plaque chauffante à 37°C afin d’initier la gélification du collagène.

3.1.1.5 Protocole

Le protocole est expliqué pour la production de sphères d’alginate. Avec l’alginate, la géométrie de la Figure 3.1a est utilisée.

L’hydrogel est injecté au sein du canal central de la phase dispersée à l’aide du contrôleur de pression. Lorsque la présence de l’hydrogel au sein du canal central est détectée, une pression est appliquée afin d’injecter l’huile au sein des canaux de la phase continue et l’huile pré-gélifiante HS+2%AC au sein des canaux latéraux du module de pré-gélification. Les pressions appliquées doivent permettre l’avancée des huiles tout en stabilisant l’alginate dans le canal, sans générer de reflux. Les huiles pénètrent les canaux de la carte microfluidique et évacuent l’air. En utilisant des tubes d’injections de liquide de taille identique, la pression à imposer à l’huile et à l’huile pré-gélifiante doit être quasiment identique afin de générer un co-écoulement. Une fois l’air évacué, la pression au sein du canal d’alginate est légèrement augmentée afin de générer une avancée de l’alginate. Les gouttes se forment alors. Le tube de sortie de la carte transportant les microsphères est inséré au sein d’un tube Falcon 50 mL contenant 5 mL de bain de calcium. Des gouttes d’huile contenant des microgouttes d’alginate pré-gélifiées se forment au niveau de l’embout du tube de sortie et chutent dans le bain de calcium. Les microsphères sédimentent ainsi dans le bain de calcium et terminent leur gélification. Toutes les 5 minutes, le Falcon 50mL de récupération est changé afin d’assurer un temps de gélification à peu près uniforme pour toutes les microsphères produites.

Dans le cas de la production de microsphères de collagène, l’ensemble est placé dans une enceinte réfrigérée à 4°C et le tube de récupération transporte les microsphères vers un bain de récupération aqueux placé sur une plaque chauffante (Figure 3.5c).

3.1.2 Centricaps

Un second système de production de microsphères a été conçu. Ce système repose sur l’expulsion de biopolymère visqueux au travers d’une aiguille par application d’une force centrifuge. Ce système s’inspire de la publication de Morimoto *et al.* [264] utilisant la force centrifuge afin d’expulser des gouttes de biopolymère d’une aiguille. Il est composé d’un réservoir contenant le biopolymère, d’un microtube permettant d’expulser le biopolymère et d’un second réservoir contenant la solution gélifiante. Son principe est expliqué Section 4.3.2

3.1.2.1 Fabrication du dispositif

L'en-tête Centricaps, servant de point de fixation à l'aiguille, est usiné dans une plaque de COC. Un cylindre de diamètre 1,7 mm (diamètre interne du tube Falcon 15mL) est construit par fraisage d'une plaque en COC de 2 mm d'épaisseur (Figure 4.30a). Un canal traversant de 1 mm de diamètre, destiné à la future insertion de l'embout de l'aiguille, est percé au centre du cylindre avec un forêt adapté. Deux pas de vis latéraux sont intégrés au cylindre; ces pas de vis permettent de placer deux vis et de fixer le dispositif dans le tube Falcon. A l'aide d'une fraiseuse, deux glissières sont creusées dans la paroi d'un tube Falcon 15mL. Les glissières sont creusées de l'embout jusqu'à la graduation 13 mL du tube.

Plusieurs dispositifs Centricaps sont développés et utilisés en parallèle afin de permettre une production plus importante de microsphères. Dans notre cas, un dispositif Centricaps produit généralement environ 1000 microsphères par centrifugation de 5 minutes. Les tubes Falcon sont réutilisés d'une expérience à une autre, et sont stérilisés par chauffage à l'autoclave ou par lavage avec de la javel.

3.1.2.2 Protocole

Le dispositif Centricaps est bien adapté pour la production de microsphères à base d'alginate, grâce à sa gélification rapide. Nous utilisons ces dispositifs pour produire des microsphères à partir d'un mélange d'alginate et collagène. Sachant que les paramètres du dispositif Centricaps dépendent du biopolymère utilisé, nous détaillons le protocole pour la production de microbilles à partir d'un mélange d'alginate SLM à 2% et de collagène à 3 mg/mL. On note la solution : SLM2-Col3.

Comme indiqué précédemment, chaque contenant utilisé et chaque solution sont placés préalablement dans un bac à glace ou conservés au réfrigérateur afin d'éviter une gélification du collagène avant chauffage de la solution.

- o Le tube est rempli avec 10,5 mL de bain de calcium pour permettre la gélification de l'alginate et est conservé dans un bac à glace afin de prévenir une gélification du collagène à température ambiante.
- o L'aiguille est insérée dans l'en-tête Centricaps et est fixée de sorte à ce que l'embout de l'aiguille se situe à 2,6 cm au-dessus du bain de calcium (l'embout de l'aiguille est aligné avec la graduation 12,5 mL du tube Falcon). Une aiguille Optimum[®] (Nordson EFD) de diamètre interne 250 μm (aiguille rouge) est utilisée ce qui nous permet de produire des microsphères de diamètre inférieur à 400 μm .
- o **Préparation du biopolymère :** une solution de collagène neutralisé est préparée, comme indiqué dans la section 3.1.1.3, à la concentration de 6 mg/mL. 250 μL de cette solution sont ajoutés à 250 μL d'alginate SLM à 4%. La solution est homogénéisée par resuspension délicate avec la pipette pour fluide visqueux.
- o 100 μL de biopolymères liquides sont placés dans le réservoir de l'aiguille.

- o Le système est ensuite chargé dans une centrifugeuse (Eppendorf, 5810) et centrifugé à 550g durant 5 minutes.
- o Les microsphères formées se situent dans le fond du tube Falcon. Le bain de calcium est alors retiré et les microbilles sont récupérées dans du sérum physiologique.

Les microsphères produites peuvent être utilisées pour construire un empilement de microsphères.

3.2 Construction de l'empilement et perfusion

Des microbilles sont produites et empilées dans une chambre microfluidique afin de former un milieu poreux perfusable. Des cellules endothéliales sont cultivées sur les parois de ces microsphères afin de former un endothélium. Un flux est ensuite appliqué et ajusté de sorte à imposer un cisaillement de l'ordre physiologique à la surface des microsphères, donc sur les cellules endothéliales.

3.2.1 Recouvrement des microbilles de cellules endothéliales

3.2.1.1 Culture cellulaire

La lignée de cellules endothéliales HMECs-GFP (pour Human Microvascular Endothelial Cells) est utilisée pour nos expériences. Ces protéines expriment une fluorescence verte facilitant leur visualisation.

Ces cellules sont cultivées dans du milieu de culture DMEM (Gibco[®]) complété par 10% de sérum de veau foetal (FBS pour Fetal Bovin Serum) (Gibco[®], 10270) et 1% de pénicilline et streptavidine (Gibco[®], 15140).

3.2.1.2 Protocole d'accroche

Une fois les billes de collagène et d'alginate produites, des cellules endothéliales sont mises en contact avec les microsphères afin de faire adhérer les cellules endothéliales à la surface des microsphères. L'adhérence est améliorée par recouvrement de la surface des microbilles avec du collagène.

Les microbilles sont placées dans une solution de sérum physiologique contenant du collagène neutralisé à 1 mg/mL à 4°C durant 1 heure, en resuspendant régulièrement la solution. Au bout d'une heure, la solution est retirée et les billes sont transférées dans du milieu de culture à 37°C. Le milieu de culture utilisé est composé de calcium concentré à 1.8 mM, proche de la concentration de la solution de sérum physiologique. Cette concentration est suffisante afin de maintenir la gélification des structures d'alginate. Environ 800 microbilles et 500.000 cellules contenues dans 2 mL de milieu de culture sont placées dans un tube Falcon[®] 5 mL à fond rond (Corning, 352235) à 37°C. Le milieu contenant microbilles et cellules est resuspendu délicatement avec une pipette toutes les 20 minutes durant 4 heures, afin de permettre aux cellules d'accrocher les microsphères.

Après les 4 heures de resuspension, les microbilles sont récupérées et cultivées dans une plaque 12 puits de culture de suspension cellulaire (Greiner Bio-One, 665102) afin d'éviter que les cellules endothéliales se développent préférentiellement sur le fond des flasques. Les microbilles sont cultivées ainsi entre 1 et 2 jours avant injection dans la chambre microfluidique.

3.2.2 Empilement des microbilles

Une carte microfluidique contenant une chambre d'empilement des microsphères est conçue et les microsphères sont injectées dans cette chambre.

3.2.2.1 Construction de la carte microfluidique

Géométrie de la chambre

Les cartes de formation de tissus sont conçues en COC avec les mêmes techniques présentées dans la partie 3.1.1.2. Plusieurs géométries peuvent être développées dans la carte microfluidique pour la chambre de formation du tissu et ont été développées durant cette thèse. L'équipe de Hughes *et al.* développe leur réseau microvasculaire dans une chambre en forme de diamant [61]. Des géométries similaires possédant des élargissements / rétrécissements des canaux ont été développées, comme on peut le voir sur la Figure 3.6a. Cependant, la vitesse d'un fluide dans un canal microfluidique dépend du débit appliqué et de la section du canal. Ainsi, nous décidons de concevoir des chambres à section fixe afin de faciliter dans un premier temps l'étude de l'écoulement. A terme, la géométrie de la chambre pourra être modifiée pour développer des structures plus complexes, et favoriser l'anastomose des futurs capillaires, par exemple. Plusieurs sections de canal ont été fabriquées afin d'augmenter le nombre de microsphères à l'intérieur de la chambre.

Intégration d'un filtre de rétention

La carte microfluidique doit intégrer un filtre mécanique afin de retenir les microsphères et former l'empilement de microsphères tout en permettant le passage du flux au travers. Plusieurs techniques de rétention des microsphères ont été recherchées et testées.

La première stratégie de rétention des microbilles a été l'insertion d'un filtre de porosité inférieure à $10\ \mu\text{m}$ en aval de la chambre microfluidique (Figure 3.6a). Ce filtre a été intégré par usinage de canaux microfluidiques dans différentes plaques de COC, puis empilement et collage de ces plaques les unes sur les autres.

La seconde technique de rétention consiste en l'insertion de piliers verticaux espacés de $150\ \mu\text{m}$, dimension inférieure aux diamètres des microsphères (Figure 3.6b). Les piliers sont cylindriques de diamètre $200\ \mu\text{m}$ et de longueur égale à l'épaisseur de la chambre microfluidique plus $300\ \mu\text{m}$. Des puits de $210\ \mu\text{m}$ de diamètre et $300\ \mu\text{m}$ de profondeur sont creusés dans la carte de COC au moyen d'un forêt. Les piliers sont glissés dans ces puits et la carte est refermée.

La troisième technique de rétention utilise une marche mécanique d'ouverture $150\ \mu\text{m}$. La marche est directement usinée dans la plaque en COC et permet la rétention des

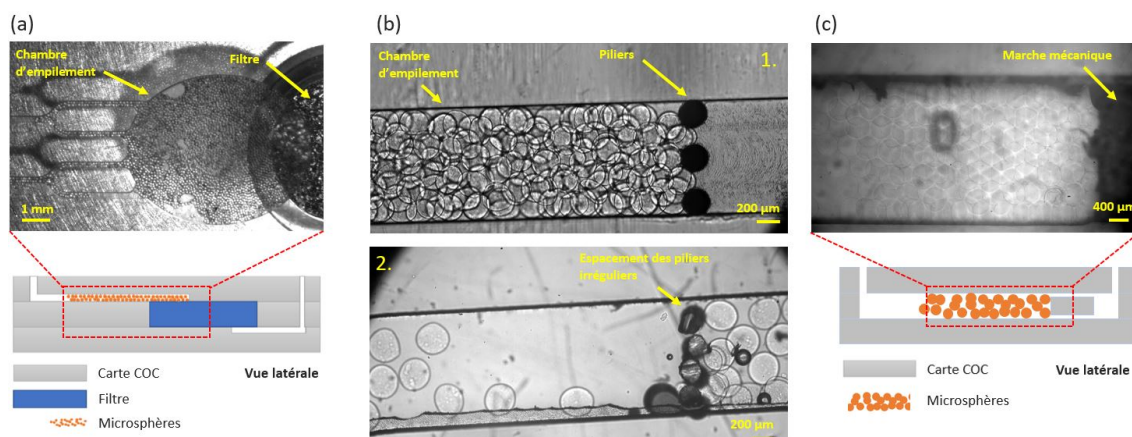


FIGURE 3.6 – Trois techniques de conception d’un filtre de rétention des microsphères.

(a) Chambre retenant des billes de polystyrènes de $200\ \mu\text{m}$ et schéma d’une vue latérale de la chambre. (b)1. Chambre retenant des microsphères de SLM1-Col3 de $300\ \mu\text{m}$ grâce à des piliers de $200\ \mu\text{m}$ espacés de $150\ \mu\text{m}$. 2. Piliers penchés empêchant la rétention des microsphères. (c) Chambre retenant des microsphères de SLM1-Col3 de $300\ \mu\text{m}$ grâce à une marche mécanique d’ouverture $150\ \mu\text{m}$ et schéma d’une vue latérale de la chambre.

microsphères de $300\ \mu\text{m}$ (Figure 3.6c).

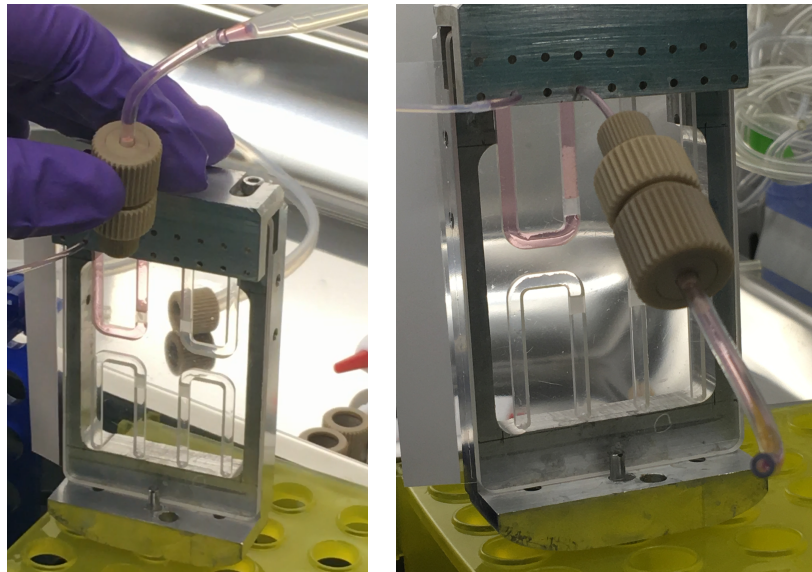
Fermeture de la carte

Les premières cartes conçues ont été refermées comme indiqué précédemment, à l’aide d’une plaque de COC collée thermoplastiquement. Cependant, des besoins de récupération de la construction tissulaire développée en carte ont amené à considérer un capot de fermeture de carte ouvrable. Plusieurs solutions d’ouvertures de carte ont été envisagées, et la solution la plus facilement implémentable a été retenue.

Les cartes microfluidiques sont refermées d’un côté à l’aide d’une plaque de COC contenant des puits d’entrées/sorties permettant la connexion avec les tubes microfluidiques. L’autre côté de la carte est refermé à l’aide d’un film adhésif optique biocompatible Applied Biosystems[®] MicroAmp[®] (ThermoFischer, 4311971). Ce film adhère à la plaque de COC et permet l’observation optique. De plus, il peut être détaché ou découpé une fois l’expérience terminée afin de récupérer le contenu de la chambre.

3.2.2.2 Injection des microsphères

Des tubes microfluidiques sont connectés aux puits d’entrées de la carte grâce au système Flowpad[®]. Une pipette est ensuite utilisée pour injecter délicatement les microsphères dans la chambre microfluidique (Figure 6.11). Il arrive que les microsphères se bloquent et forment des amas ; ces amas peuvent se coincer dans les tubes et les connectiques lors de l’injection. Lorsque cela arrive, le liquide est aspiré et réinjecté délicatement à plusieurs reprises afin de remettre en suspension les microsphères et permettre le passage au travers



(a) Injection des microsphères dans la carte à l'aide d'une pipette.

(b) Chambre contenant l'empilement de microsphères.

FIGURE 3.7 – Injections des microsphères dans la chambre microfluidique.

des points bloquants.

Une fois les microsphères injectées, les tubes sont connectés au système de perfusion et le flux est initié.

3.2.3 Caractérisation du flux

Des expériences de mesures expérimentales de vitesses et de cisaillement au sein de l'empilement de sphères ont été mises en place. Une technique a été utilisée afin de mesurer le flux au sein de micropores : la μ PIV (pour MicroParticle Image Velocimetry). Elle a été pour la première fois introduite par Santiago *et al.* en 1998 [265].

3.2.3.1 Principe de la μ PIV

La μ PIV est basée sur la technique de PIV. Cette technique consiste en l'injection de micro-particules fluorescentes dans le milieu perfusé et au suivi du déplacement de ces micro-particules. Les micro-particules doivent être assez petites pour suivre le déplacement du fluide étudié. Elle permet de mesurer le champ de vitesse dans un plan. La PIV mesure le champ de vitesse dans le plan formé par une nappe laser. L'écoulement est éclairé par une nappe laser. Deux images successives de l'écoulement ensemencé de traceurs fluorescents sont enregistrées par une caméra rapide. Un programme d'intercorrélation permet de déterminer le déplacement de groupes de traceurs. Connaissant le déplacement et le temps entre les deux images, un logiciel reconstruit le champ de vitesse dans le plan.

Le principe de la microPIV est le même si ce n'est que l'écoulement (qui doit être stationnaire) est mesuré sous microscope. L'écoulement est entièrement éclairé. Le plan de mesure est le plan focal de l'objectif. L'ensemencement en traceurs est faible afin de ne pas brüiter les images. Cela est compensé par une acquisition importante de paires d'images. Le calcul d'intercorrélacion est donc fait non pas sur seulement deux images mais sur des centaines d'images.

3.2.3.2 Acquisition des images

Un dispositif classique de PIV est constitué :

- **Des particules de traçages.** Ces particules sont fluorescentes afin de permettre leur détection optique. Elles doivent être suffisamment petites pour suivre les mouvements du fluide et ne pas le perturber. Néanmoins, elles doivent être suffisamment grandes pour que la quantité de lumière émise puisse être détectée. Il est estimé que le diamètre des particules de traçage doit être plus petit d'au minimum 10 fois la dimension des canaux microfluidiques afin de suivre convenablement les mouvements du flux sans le perturber. Pour des dimensions microfluidiques, cela amène à utiliser des particules de faible dimension, pouvant être soumises au mouvement Brownian introduisant une erreur sur la mesure de vitesse [266]. Ainsi, les plus petites particules dont le déplacement suit au mieux les mouvements du fluide et dont la fluorescence peut être détectée doivent être utilisées.
- **D'un microscope optique équipé d'une source lumineuse d'excitation.** Les lasers sont majoritairement utilisés en tant que source d'excitation lumineuse dans les dispositifs de PIV car ils permettent d'appliquer une excitation puissante sous des durées courtes d'impulsion. Les dispositifs optimaux de PIV utilisent des lasers pulsés afin d'exciter les particules de traçage sur une durée d'excitation très courte et réduire le temps d'exposition des particules. L'utilisation d'un laser pulsé réduit ainsi le bruit des images acquises.
- **Une caméra d'acquisition.** Une caméra optique est combinée aux microscopes afin d'acquérir des images successives des particules excitées. L'utilisation de caméra rapide aux fréquences d'acquisition élevées permet d'obtenir des images successives de déplacement court des particules.

Les dispositifs de μ PIV utilisent un microscope épifluorescent, excitant l'échantillon sur un volume plutôt qu'un plan (Figure 3.11). L'échantillon est illuminé sur toute son épaisseur et le plan de mesure est le plan focal défini par la configuration optique du microscope. De par l'excitation sur tout le volume du canal, le rapport signal sur bruit est plus faible pour les dispositifs de μ PIV. Il est possible d'ensemencer moins de particules de traçage afin de réduire le bruit mais il est nécessaire de conserver une densité de particules fluorescentes suffisantes afin de les détecter en tout point du champ d'observation. Une autre solution peut être de réduire l'épaisseur du canal d'observation [267], mais cette

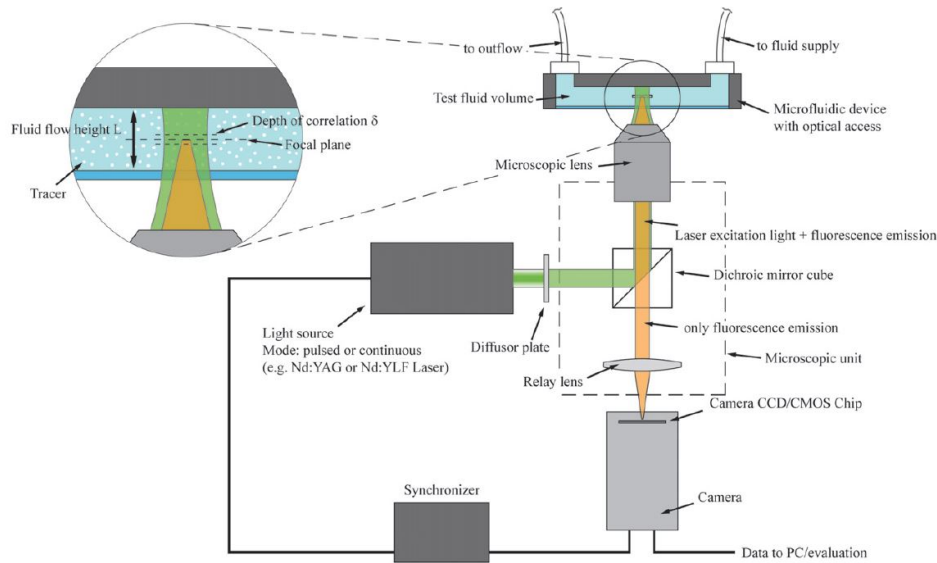


FIGURE 3.8 – Schéma d'une installation optique de μ PIV classique [268].

solution dépend de l'étude et n'est pas applicable dans notre cas d'étude de l'écoulement au sein d'un empilement de sphères épais.

Un dispositif de μ PIV optimal combine un laser pulsé avec une caméra rapide. Le laser fournit ainsi une puissance d'excitation suffisante et les impulsions permettent de réduire le temps d'exposition, donc le bruit des particules fluorescentes en mouvement. La synchronisation du laser avec une caméra rapide permet également d'acquérir des images à des temps très rapprochés, augmentant la résolution de la technique de μ PIV. Néanmoins, ces équipements sont coûteux.

Expérience

Des particules de traçage de $3 \mu\text{m}$ de diamètre sont perfusées au sein de l'empilement de sphères. Dans leur publication, Sen *et al.* ont perfusé des particules de traçage de $2 \mu\text{m}$ de diamètre au sein d'un empilement de sphères de $200 \mu\text{m}$ et ont calculé que l'erreur due au mouvement brownien était inférieure à 1% [269]. Comme nous nous plaçons dans des conditions similaires à leur étude, nous considérons que l'erreur due au mouvement brownien dans notre structure est similaire donc négligeable.

Des microbilles fluorescentes (Ex : 468 nm / Em : 508 nm) de $3 \mu\text{m}$ de diamètre (G0300, Duke Scientific) sont insérées dans le liquide de perfusion. 5 gouttes de la solution mère sont insérées dans un tube Eppendorf 2mL et lavées à 3 reprises avec de l'eau distillée par centrifugation et reprise du culot. Après lavage, les microbilles sont resuspendues dans 1 mL de PBS 1X. $200 \mu\text{L}$ de la solution de microbilles fluorescentes sont ensuite ajoutés dans 50 mL de sérum physiologique. L'ensemble sérum physiologique et microbilles fluorescentes constitue la solution de perfusion. Cette solution est chauffée à 37°C (futur température de chauffage de l'empilement) et est mélangée en continue par un agitateur

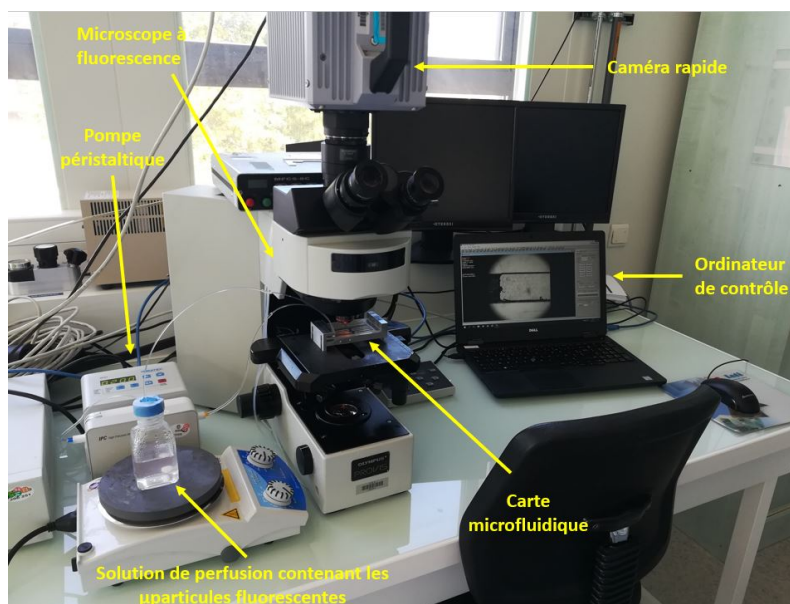
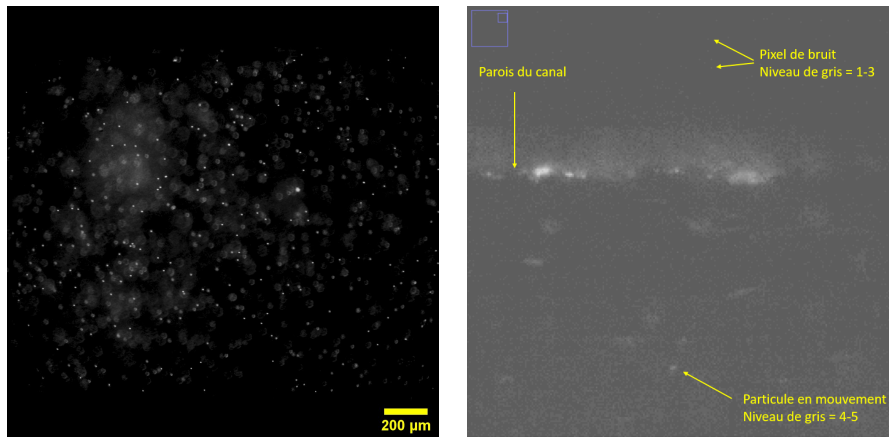


FIGURE 3.9 – Banc expérimental pour la μ PIV.

magnétique afin d'éviter la sédimentation des microbilles. La solution est injectée à l'aide d'une pompe péristaltique Ismatec® (IPC-N 8).

Le banc expérimental est présenté Figure 3.9). Un microscope AX70 muni d'un objectif x10 et x5 ainsi que d'un cube de filtres FITC (Ex 472/30, Em 520/35, DM 498). L'acquisition des images est effectuée avec une caméra ultra-rapide Photron Fastcam SA 1.1 à des fréquences d'acquisition allant de 520 images/sec à 2000 images/sec pour un temps d'acquisition de 0,18 ms. Une lampe à mercure (FranceLampes, HBO 103w/2 OSRAM) combinée à un filtre FITC permet d'exciter les billes fluorescentes. Les images sont acquises dans différents plans de l'empilement.

Deux difficultés sont rencontrées avec notre dispositif de μ PIV. Le premier est que notre échantillon est excité sur toute la profondeur du dispositif ce qui provoque des cellules hors plan focal (Figure 3.10a). Le second problème est que l'utilisation d'une lampe mercure plutôt qu'un laser engendre une faible puissance d'excitation et donc une faible fluorescence des particules de traçage. Afin d'améliorer la fluorescence des particules, le temps d'exposition doit être suffisant. Par exemple, la Figure 3.10b montre une image enregistrée pour une fréquence d'acquisition de 2000 fps, où l'on distingue péniblement des particules au niveau d'une paroi du canal : la valeur de niveau de gris des pixels d'une particule en mouvement est de 3-4. La fréquence d'acquisition est beaucoup trop importante pour permettre une détection efficace des particules en mouvement. Nous nous limitons ainsi à des enregistrements d'images à faible fréquence d'acquisition. Une fréquence d'acquisition de 125 fps permet une bonne distinction des particules fluorescentes. Le débit de 50 μ L/min convient pour cette fréquence d'acquisition, car il provoque un déplacement des particules entre deux images inférieur à environ 20 pixels, condition indispensable au bon calcul de



(a) Bruit de fond des microsphères hors plan focal (fréquence d'acquisition : 125 fps). (b) Fluorescence des particules pour une fréquence d'acquisition de 2000 fps.

FIGURE 3.10 – Problèmes liés aux acquisitions d'images non traitées.

corrélation.

3.2.3.3 Traitement des images

Après l'acquisition d'images successives, ces dernières doivent être analysées afin d'associer un vecteur vitesse au déplacement de chaque particule et ainsi établir un champ de vecteurs vitesse du plan d'observation. Chaque image est découpée en une grille uniforme, que l'on appelle fenêtre d'interrogation (Figure 3.11a). La taille des fenêtres d'interrogation doit être assez petite pour que le déplacement d'une particule en son sein soit uniforme, mais assez large pour que les fenêtres d'interrogation contiennent plusieurs particules. La taille des fenêtres d'interrogation est généralement choisie entre 64×64 , 32×32 ou 16×16 pixels, de sorte à ce qu'elles contiennent 3 particules. Dans une fenêtre d'interrogation prise à l'instant t , les particules sont détectées. Chacun des déplacements possibles au sein de la fenêtre d'interrogation est appliqué à chacune des particules et comparé à la fenêtre d'interrogation de l'instant $t + dt$ (Figure 3.11b). Comme plusieurs particules sont contenues dans la fenêtre d'interrogation, plusieurs déplacements peuvent être associés à une particule. Cependant, en effectuant la somme des correspondances de déplacement possibles pour chacune des particules, on obtient une figure d'auto-corrélation dont le maximum correspond au déplacement le plus probable de l'ensemble des particules. Ce déplacement est alors associé à la fenêtre d'interrogation.

Généralement, il est difficile pour les expériences de μ PIV d'injecter une concentration de particules suffisantes afin d'obtenir au moins 3 particules par fenêtre d'interrogation. En effet, l'utilisation de forte densité de particules de traçage résulte généralement en un fort bruit de fond perturbant la mesure. Dans le cas de l'étude de flux en régime stationnaire, il est possible de calculer le champ de vitesse sur une large gamme d'images. Meinhart *et*

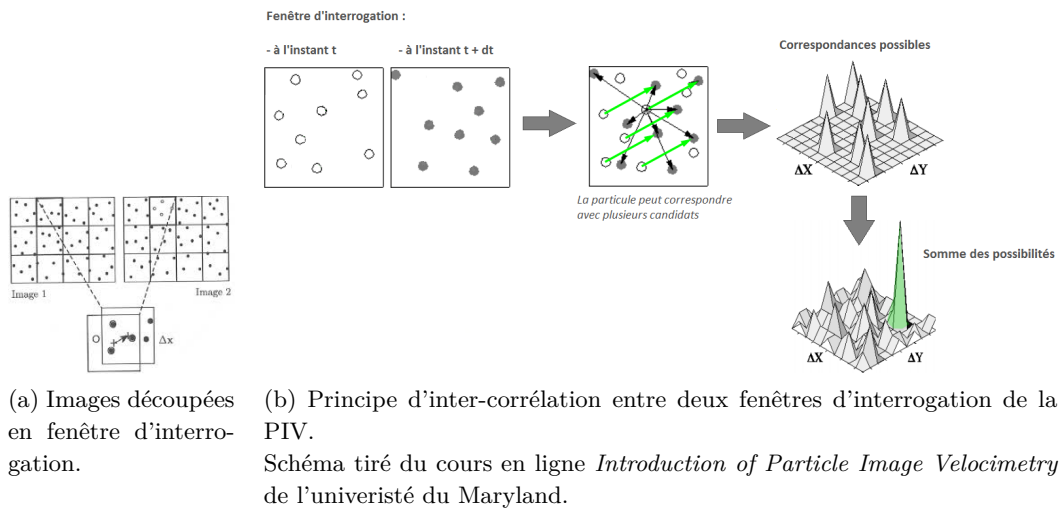


FIGURE 3.11 – Principe des mesures d'intercorrélation entre deux images.

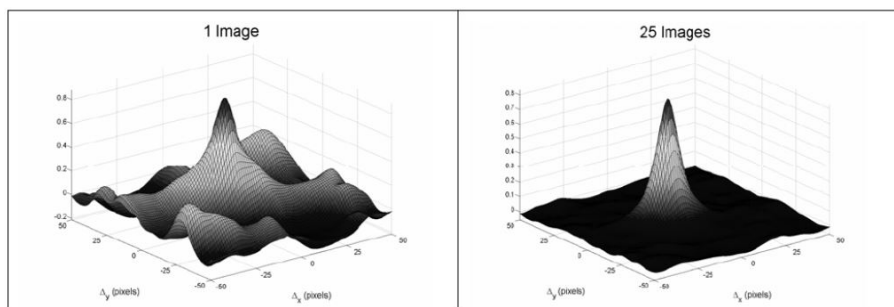


FIGURE 3.12 – Amélioration de l'auto-corrélation d'images par la méthode de la moyenne d'ensemble [270].

al. ont introduit la méthode de la moyenne d'ensemble pour la PIV : cette méthode calcule la fonction de corrélation moyenne comme la somme des fonctions de corrélation issues de la corrélation croisée de l'ensemble des images [267]. Cette technique permet d'augmenter virtuellement le nombre de particules par fenêtre d'interrogation car, au sein d'une fenêtre d'interrogation, les matrices de corrélation sur toutes les images sont ajoutées et le maximum des corrélations est recherché parmi la somme de toutes les matrices de corrélation. Cette méthode améliore en plus le signal en réduisant le bruit (Figure 3.12). Venneman *et al.* montrent, dans leurs conditions expérimentales, que la moyenne de corrélation établie sur 50 paires d'images permet d'obtenir des vecteurs vitesses valides à 100% [271]. Linkden *et al.* précisent que ce nombre augmente lorsque la concentration en particules est faible ou que le bruit de fond est important [268]. Westerweel *et al.* montrent que la méthode de moyenne d'ensemble permet également d'augmenter la résolution spatiale de la μ PIV [272].

Par ces méthodes, un vecteur déplacement est associé à chaque fenêtre d'interrogation. Ainsi, en associant ce déplacement à la fréquence d'acquisition entre chaque images, on obtient un champ de vecteur vitesse de l'image.

Réalisation des calculs

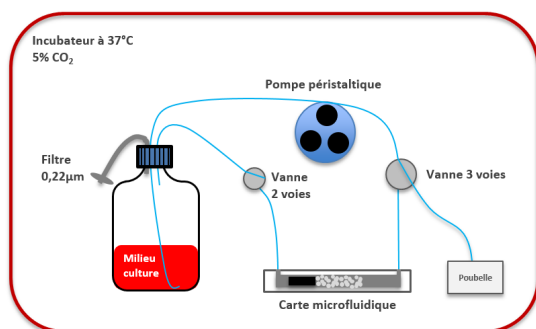
Le traitement des images est réalisé à l'aide du logiciel de calcul Matlab®. Les calculs sont réalisés à l'aide d'un logiciel de μ PIV fourni par Wereley et Meinhart [267]. Un recouvrement de 50% est utilisé pour le calcul de corrélation entre les images, et les mesures sont réalisées sur 1000 acquisitions.

Une fois le champ de vecteur mesurée, le champ des cisaillements est calculé à l'aide du programme disponible en annexe.

3.2.4 Perfusion de l'empilement

En culture cellulaire classique, les cellules sont cultivées au sein d'une enceinte de culture à 37°C et 5% de CO₂. Les cellules se développent dans des bouteilles (flasques) de culture fermées par un filtre 0.22 μ m afin de conserver la stérilité de l'environnement à l'intérieur de la bouteille tout en permettant les échanges gazeux entre le milieu de culture et l'enceinte. Au sein de notre circuit fermé, ces échanges gazeux doivent pouvoir se réaliser. De nombreuses plateformes microfluidiques intégrant des cultures cellulaires sont construites dans du PDMS qui est perméable aux gaz et permet donc ces échanges. Dans notre cas, la carte microfluidique en COC est imperméable aux gaz. Nous avons donc décidé d'intégrer un filtre 0.22 μ m à la bouteille contenant le milieu de culture offrant une ouverture entre l'enceinte et le milieu contenu dans la bouteille, tout en conservant le circuit fermé stérile. Ainsi, le milieu perfusé est oxygéné, condition essentielle à la culture cellulaire. Lors d'une expérience, la bouteille contenant le milieu de culture est placée 1 jour avant dans l'incubateur afin d'équilibrer l'oxygène au sein du milieu de perfusion.

Un circuit de type bioréacteur est conçu pour permettre la perfusion de l'empilement



(a) Schéma du dispositif de perfusion.



(b) Photographie du dispositif de perfusion hors étuve.

FIGURE 3.13 – Banc expérimental de perfusion de la carte microfluidique contenant l'empilement de microsphères.

en continu (Figure 3.13) à partir d'une bouteille en verre contenant 50 mL de milieu de culture des cellules endothéliales. Le bouchon de cette bouteille a été usiné afin de permettre la connexion de deux tubes microfluidiques et l'insertion d'un filtre 0,22 μm (Sartorius Midisart[®], 17805). Le milieu de culture est relié à une pompe péristaltique (Ismatec[®], IPC-N 8) par un tube de diamètre 1,65 mm (Ismatec[®], SC0018) permettant de calibrer le débit de 35 $\mu\text{L}/\text{min}$ jusqu'à 3,5 mL/min. La pompe péristaltique est ensuite reliée à une vanne 3 voies afin de connecter la bouteille de milieu de culture soit à l'entrée de la carte microfluidique, soit à un réservoir poubelle. Ce réservoir contient également un filtre afin d'assurer la stérilité du système.

Des vannes ont été ajoutées au circuit afin de permettre l'interruption de la perfusion sans provoquer de reflux du milieu pouvant détériorer l'empilement des microsphères. Une vanne trois voies (Cole Parmer, 30600-04) est ainsi placée entre la pompe péristaltique et l'entrée de la carte microfluidique. La troisième sortie de cette voie est reliée à un long tube poubelle, lui-même relié à un filtre 0,22 μm afin de conserver la stérilité du circuit. Une vanne deux voies (Cole Parmer, 30600-00) est également ajoutée dans la boucle de retour vers la bouteille de milieu de culture. Ainsi, lors d'une perfusion en cours, la vanne 3 voies permet de rediriger le flux non plus vers la chambre de culture mais vers la sortie poubelle. La vanne 2 voies est alors directement fermée coupant tous les accès vers la chambre. La pompe péristaltique peut ensuite être arrêtée.

L'écoulement circule au sein des porosités de l'empilement des microsphères. La faible dimension des pores dans ce circuit crée de fortes pertes de charges augmentant la pression au sein du système. Les connectiques entre les différents éléments du banc de perfusion doivent ainsi être robustes afin d'éviter des fuites ou un débranchement des connectiques. Des connecteurs pour tube péristaltique (IDEX, P767) sont utilisés pour relier les éléments du système entre eux. Des colliers de serrage (Legrand, 032030) sont également utilisés afin de resserrer les tubes au niveau des connectiques et renforcer les connexions.

3.3 Caractérisation du réseau vasculaire

Des expériences de perfusion d'empilements de microsphères recouvertes de cellules endothéliales ont été réalisées. Les empilements sont formés et perfusés durant plusieurs jours. La carte microfluidique a été conçue de sorte à pouvoir récupérer la construction en fin d'expérience et d'effectuer des caractérisations sur le tissu formé.

Afin de caractériser la perfusabilité de notre construction, de la lectine a été injectée lors de certaines expériences. La lectine a pour propriété de se greffer à la surface des cellules endothéliales. Des fluorochromes peuvent être liés à la lectine et permettre de la détecter. De la lectine LEL (pour *Lycopersicon Esculentum* Lectin) contenant un marqueur fluorescent à la longueur d'onde 488 nm (Vector laboratories^o, DL-1174) est achetée. Cette lectine est perfusée dans l'empilement et permet de marquer les cellules endothéliales en contact avec le liquide de perfusion. Ainsi, la lectine sert de marqueur afin d'identifier l'ouverture des pores formés par l'empilement de microsphères et des capillaires. Entre 50 et 200 μL (selon les expériences) de la solution mère de lectine à 1 mg/mL sont ajoutés à 5 mL de milieu de culture et perfusés au sein de l'empilement durant au minimum 1 heure. Du milieu de culture ne contenant pas de lectine est ainsi perfusé dans un second temps afin d'évacuer la lectine résiduelle n'ayant adhéré à aucune cellule endothéliale.

Une fois les expériences de perfusion réalisées, la construction tissulaire peut être récupérée. Le film optique μAMP est décollé de la plaque en COC et la construction tissulaire est prélevée de la chambre avec une spatule. L'ensemble se retire facilement de la chambre et est déposé dans un bain de formaline à 10% (Sigma Aldrich, HT501128) afin de fixer les protéines des cellules. Il est conservé à 4°C dans cette solution une journée. La formaline est ensuite retirée et le tissu est lavé avec du PBS10X à deux reprises. Il est ensuite placé dans une solution de sucrose à 10% (Sigma Aldrich, S7903) pendant une journée à 4°C, puis dans une solution de sucrose à 20% une journée supplémentaire.

Plusieurs analyses peuvent être menées sur l'empilement de billes vascularisées. Au vu des équipements disponibles, nous avons surtout effectué des caractérisations par analyse de section de l'empilement. Les sections sont réalisées à l'aide d'un cryostat en découpant de fines tranches de l'ensemble tissulaire et en analysant les sections afin d'observer des tubes creux endothélialisés.

Le cryomicrotome est un appareil permettant des coupes cryostat. Cet instrument est utilisé pour la découpe de tissus biologiques ou d'organes. Un microtome (LEICA, CM3050S) permet d'effectuer des coupes de l'empilement de quelques micromètres. Le cryomicrotome est thermalisé à -24°C. Le tissu est placé, à l'aide de spatules, au sein d'un moule plastique adapté au cryomicrotome. La construction est orientée selon les sections longitudinales ou transverses que l'on souhaite étudier. De la colle OCT (pour Optical Coherence Tomographie) est coulée au sein du moule et placée dans un bac de carboglace afin de permettre à l'OCT de congeler. Une fois congelé, le bloc est placé au sein du cryostat et des coupes de 10 à 50 μm sont réalisées. Les tranches découpées sont récupérées avec une lame de verre à température ambiante. La différence de température entre la lame et l'enceinte réfrigérée permet à la tranche découpée d'adhérer spontanément à la lame

de verre plus chaude. Chaque découpe est ainsi récupérée sur lame de verre et peut être observée. Les tranches sont ensuite stabilisées par déposition de gouttes de la solution fluorSave Reagent (345789).

Les noyaux des cellules ont été marqués avec du Hoescht (33342).

Chapitre 4

Conception des microsphères

Afin de former la configuration présentée dans le chapitre précédent, il faut fabriquer des microsphères que nous recouvrirons ensuite de cellules endothéliales. Nous les empilerons dans une chambre adaptée afin de former un empilement offrant la structure poreuse adéquate au développement du réseau de capillaires. Ces microsphères pourront inclure des cellules afin de reproduire l'environnement du tissu d'intérêt. Ce chapitre traite de la production des microsphères.

4.1 Techniques d'encapsulation et biopolymère

On appelle microencapsulation le procédé d'inclusion de composants actifs au sein de sphères de dimensions comprises entre 1 μm et 1 mm. Les microsphères sont conçues à partir d'un matériau dépendant de l'application souhaitée. En ingénierie tissulaire, l'encapsulation est un procédé largement utilisé afin de fournir un environnement de culture cellulaire en 3 dimensions aux cellules encapsulées. En utilisant des biomatériaux reproduisant les propriétés de la matrice extracellulaire des tissus, les microsphères permettent de recréer un microenvironnement favorable à la prolifération et la différenciation cellulaire. Un des principaux avantages de l'encapsulation est de permettre une oxygénation de l'ensemble des cellules incluses dans la sphère.

4.1.1 Les techniques d'encapsulation

La microencapsulation consiste en la formation de gouttes à partir d'un mélange de biopolymère et de cellules, puis en la gélification de ces gouttes afin de former des microsphères. La gélification des gouttes dépend du biopolymère utilisé; elle peut s'effectuer par gélification ionique, thermique ou photoréticulation.

Plusieurs techniques de microencapsulation existent et peuvent être classées en deux catégories :

- o Les technologies de dripping : des gouttes sont formées par extrusion du biopolymère au travers d'une seringue.

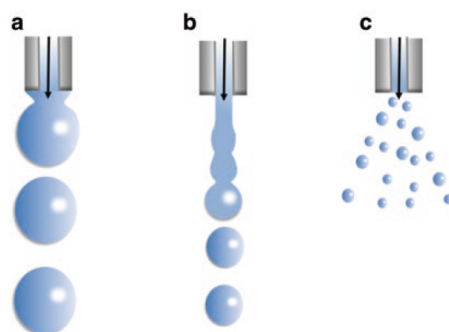


FIGURE 4.1 – Les différents régimes de dripping.

(a) régime goutte-à-goutte, (b) régime de jet, (c) régime de spray. (E. Martins ©) [273]

- o Les technologies microfluidiques : le mélange biopolymère - cellules s'écoule dans un canal de taille microfluidique dont l'une des dimensions est de l'ordre du micron ou de la centaine de microns, et la formation des gouttes est générée par cisaillement du biopolymère à l'aide d'un fluide non miscible.

4.1.1.1 Les technologies de dripping

Les technologies de dripping permettent de produire des microsphères rapidement et avec des montages relativement simples, c'est pourquoi cette méthode est la plus souvent utilisée en laboratoire. La technique de dripping repose essentiellement sur l'utilisation d'une aiguille et à l'expulsion d'un biopolymère liquide au travers de cette aiguille formant des gouttes. La génération de gouttes doit être combinée avec une méthode de gélification du biopolymère afin de conserver la structure des gouttes créées.

La vitesse à laquelle le biopolymère traverse l'aiguille influe sur l'aspect des gouttes. Si la vitesse d'expulsion du biopolymère est faible, les gouttes se forment directement au niveau de l'extrémité de la seringue, c'est le régime de goutte-à-goutte (Figure 4.1a). Lorsque la vitesse du biopolymère augmente, le biopolymère est expulsé sous la forme d'un jet, qui se sépare en gouttes par la suite, c'est le régime de jet (Figure 4.1b). La séparation en gouttes peut s'effectuer par apport de forces extérieures comme la vibration. Pour des vitesses d'expulsion encore plus importantes, l'instabilité de Plateau Rayleigh engendre la formation de petites gouttes, c'est le régime de spray (Figure 4.1c). Le jet se fragmente en gouttes pour baisser l'énergie de surface.

Pour des applications d'encapsulation cellulaire, le régime de goutte-à-goutte ou le régime de jet sont souvent utilisés car ils génèrent moins de cisaillement pouvant causer des dommages aux cellules.

Pour le régime goutte-à-goutte, le biopolymère peut être expulsé de l'aiguille par simple gravité. Lorsque la force de gravité est plus forte que la tension superficielle maintenant la goutte à l'extrémité de l'aiguille, alors la goutte se détache. De ce fait, cette technique n'est applicable que pour des polymères de faible viscosité. De plus la taille des gouttes

est généralement importante et il est difficile de produire des microsphères de diamètre inférieur à 800 μm avec cette technique.

Afin de réduire la taille des gouttes, il est possible d'appliquer un potentiel électrostatique ou un flux d'air coaxial. L'application d'un potentiel électrostatique permet de réduire la tension superficielle retenant les gouttes réduisant la force de gravité nécessaire au détachement de ces dernières. L'utilisation d'un flux coaxial permet de virtuellement augmenter la force de gravité des gouttes permettant leur détachement plus rapide. Ces techniques permettent de réduire le diamètre des gouttes détachées, mais des diamètres de microsphères de 500 μm sont difficilement atteignables et seulement pour des solutions très peu visqueuses.

Le régime de jet est également utilisé afin d'encapsuler des cellules. Pour un débit d'expulsion du biopolymère liquide suffisamment important, un jet de biopolymère se forme en sortie d'aiguille et il est possible de sectionner ce jet afin de former des gouttes. La technique la plus utilisée afin de sectionner le jet consiste en l'application de vibration générant la séparation du jet en gouttes en favorisant l'instabilité de Rayleigh [274]. L'ajustement de la fréquence de vibration et de la fréquence de production permet de générer des gouttes mono-disperses. Cette technique diminue fortement la taille des gouttes produites comparée à la technique de goutte-à-goutte. Cependant, cette méthode n'est pas compatible avec des biopolymères visqueux car ces derniers ont un effet amortissant atténuant l'instabilité générée. De plus, les paramètres de production sont difficiles à ajuster.

Une technique de dripping utilisant la force centrifuge afin d'expulser le biopolymère d'un orifice a été introduite par Haerberle *et al.* [275]. Cette technique s'apparente à celle de dripping par gravité où la force de gravité est virtuellement augmentée par la force centrifuge [276]. Ainsi, les gouttes se détachent plus tôt, et la productivité est augmentée. Morimoto *et al.* atteignent une production supérieure à 10.000 microsphères par minutes avec cette technique [264].

Hormis la méthode goutte-à-goutte, les techniques de dripping offrent des fréquences de productions élevées généralement supérieures aux milliers de gouttes par minutes pour des diamètres de microsphères atteignant le demi-millimètre. Néanmoins le diamètre des sphères diminue avec la viscosité et il est difficile de concevoir des microsphères de faible diamètre pour des biopolymères visqueux. Les microsphères produites sont sphériques et possèdent un coefficient de variation de taille compris entre 5 et 15%. Pour plus de précisions et de détails sur la technique de dripping, il est possible de se référer à l'article de Bidoret sur les méthodes de Dripping [273]. La technique microfluidique de génération de gouttes répond aux limitations des technologies de dripping.

4.1.1.2 Les technologies microfluidiques

La microfluidique est la science et la technologie de la manipulation de faibles volumes de fluides dans des canaux micrométriques. L'écoulement des fluides est régi par les lois de Navier-Stokes dont le nombre de Reynolds caractérise le régime d'écoulement (Section

5.2.1.3). Un des avantages de la microfluidique est que le régime d'écoulement en jeu est très souvent laminaire (nombre de Reynolds faible), de par les faibles dimensions, c'est-à-dire que les lignes de courant du flux sont parallèles à la direction du flux. Le régime laminaire permet un contrôle plus précis du déplacement des fluides. Un autre avantage permis par la microfluidique réside en la manipulation de fluides multiphasiques. Il est ainsi possible de concevoir des gouttes de faibles dimensions au sein d'un système microfluidique.

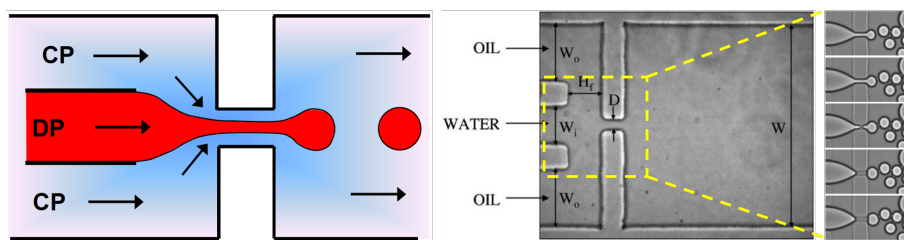
Les méthodes de génération de gouttes en microfluidique sont de deux sortes : actives et passives. Les méthodes actives utilisent une force extérieure comme un champ électrique, un système thermique ou un déclencheur piézoélectrique afin de générer la formation de gouttes. Les méthodes passives utilisent uniquement la géométrie des canaux microfluidiques et la manipulation des deux phases non miscibles afin de former des gouttes. Plusieurs revues détaillent les méthodes actives [277, 278, 279] et les méthodes passives [280, 281].

Les techniques microfluidiques passives jouent sur le co-écoulement de deux phases non miscibles au niveau d'une jonction adaptée afin de générer des gouttes. Pour la production de microsphères de biopolymère, la phase contenant le biopolymère de formation de gouttes est appelée phase dispersée, et la phase contenant le liquide non-miscible est appelée phase continue. Plusieurs géométries de jonctions sont développées afin de provoquer la formation de gouttes. L'ensemble des géométries possibles est présenté dans la revue de Vladisavljević *et al.* [281].

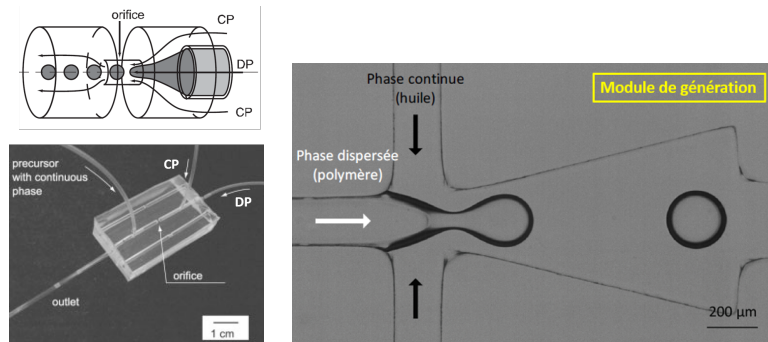
Dans notre laboratoire, la technique de focalisation d'écoulement dite MFFD (pour Microfluidic Flow Focusing Device) est utilisée depuis plus d'une dizaine d'années. Cette architecture a été présentée par Anna *et al.* afin de générer une émulsion d'eau dans de l'huile (Figure 4.2a) [282]. Avec cette technique, la phase dispersée de biopolymère est contenue dans un canal central et rejointe par deux canaux symétriques contenant la phase continue. Une interface se crée alors à la jonction entre ces trois canaux et génère un co-écoulement. Ce co-écoulement est dirigé à l'intérieur d'un orifice à section réduite. La section réduite génère un cisaillement du fluide extérieur (la phase continue) sur le fluide intérieur (la phase dispersée) provoquant le détachement de gouttes du fluide intérieur. L'orifice débouche sur un canal de sortie permettant de récupérer les gouttes produites. La géométrie présentée sur la Figure 4.2a est plane mais une version cylindrique AFFD (pour Axisymmetric Flow Focusing Device) a été développée, notamment par Takeuchi *et al.* (Figure 4.2b) [283]. La technique AFFD résout les problèmes de mouillabilité présents avec les systèmes MFFD et permet des fréquences de production plus élevées qu'avec les dispositifs MFFD. Au sein de notre laboratoire, une géométrie MFFD adaptée avec une jonction de focalisation triangulaire est utilisée (Figure 4.2c). Cette géométrie a été présentée par Tan *et al.* et améliore la monodispersité des gouttes en contrôlant précisément la localisation du cisaillement qui engendre la rupture de la phase dispersée [260].

Génération de gouttes avec le MFFD

Au sein d'un système MFFD, la production des gouttes dépend du débit de chaque phase



(a) La phase continue (CP) provoque le cisaillement de la phase dispersée (DP) au niveau de l'orifice de focalisation de l'écoulement générant le cisaillement de gouttes.



(b) Dispositif AFFD développé par Takeuchi *et al.* [283].

(c) Géométrie MFFD utilisée dans le laboratoire.

FIGURE 4.2 – Dispositifs MFFD et AFFD.

et de la géométrie (taille des canaux). Plusieurs régimes de formation de gouttes existent selon les débits imposés (ou les pressions appliquées à chaque phase) (Figure 4.3). Il est possible de tracer un diagramme de phase séparant les différents régimes de production (Figure 4.3(b)).

Le premier régime est le régime de pincement ou régime contrôlé par la géométrie (Figure 4.3(a)A). Dans ce régime, la phase dispersée forme une avancée qui occupe la quasi-totalité de la largeur de l'orifice et la phase continue circule uniquement le long de la paroi. La réduction de l'espace disponible pour la phase continue entre l'interface et les parois entraîne un gradient de pression autour de la phase dispersée. Lorsque ce gradient de pression devient supérieur à la pression à l'intérieur de la phase dispersée, l'interface de cette dernière est pincée et une goutte est détachée [279, 281].

Concernant le régime goutte-à-goutte (Figure 4.3(a)B & 4.3(b)), la phase dispersée adopte une forme de jet qui se réduit à cause de la contrainte visqueuse imposée par la phase continue. La tension interfaciale qui tend à stabiliser l'interface entre les phases continue et dispersée est dominée par les forces visqueuses provoquant le détachement de gouttes. La rupture de la phase dispersée a lieu au niveau de l'orifice. Ce régime fournit une meilleure monodispersité des gouttes dont le diamètre est proche de la largeur de l'orifice [259, 279, 281].

Le régime de jet intervient pour une augmentation du débit de la phase dispersée (Figure 4.3(a)C & 4.3(b)). Le jet formé par la contrainte visqueuse de la phase continue s'allonge et dépasse l'orifice. Il se sépare ensuite en goutte du fait de l'instabilité du Plateau-Rayleigh [274, 279, 281]. Ce régime forme des gouttes plus polydisperses que le régime goutte-à-goutte.

Le régime de tip-streaming ne peut être obtenu qu'en présence de tensioactif, pour des débits très élevés (Figure 4.3d) [284]. La phase dispersée est disposée sous la forme d'un jet long et fin au bout duquel des gouttes très fines sont formées. Il permet de réduire la taille des gouttes produites mais dépend fortement de la concentration en tensioactif.

Les paramètres influençant la production de gouttes sont la taille des canaux microfluidiques et les débits appliqués pour chaque phase. L'ajustement de ces paramètres permet de concevoir des gouttes de tailles précises et contrôlées. La technique d'encapsulation microfluidique en régime goutte-à-goutte offre une monodispersité des sphères plus faible qu'avec les autres techniques : le coefficient de variation est inférieur à 5%. Comparée à la méthode de dripping, la méthode microfluidique est compatible avec une large gamme de viscosité de biopolymère, pouvant atteindre jusqu'à plusieurs dizaines de Pa.s, pour laquelle la monodispersité de la production des gouttes reste inférieure à 5%. La taille des gouttes obtenue peut aller de quelques micromètres de diamètre à quelques centaines de micromètres selon les paramètres utilisés.

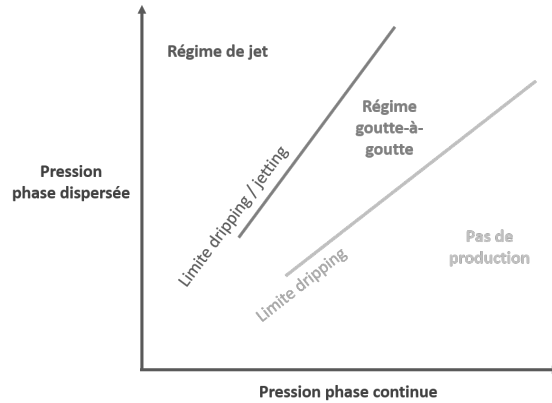
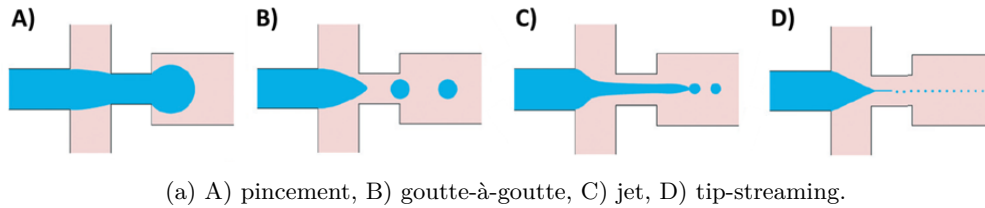


FIGURE 4.3 – Régimes de formation de gouttes pour une géométrie MFFD.

4.1.1.3 Gélification des gouttes

Une fois les gouttes formées, la gélification doit être engendrée afin de solidifier les structures et générer l'environnement sphérique solide de culture. La majorité des biopolymères utilisés en ingénierie tissulaire en tant qu'environnement de culture cellulaire est compatible avec une utilisation en tant que matériau d'encapsulation. Toutes les techniques d'encapsulation ne sont néanmoins pas compatibles avec tous les hydrogels. Gasperini *et al.* détaillent l'ensemble des biomatériaux d'encapsulation et les techniques les plus adaptées à utiliser pour chaque biomatériaux [285].

Chaque biomatériaux présentent un processus de gélification qui lui est propre. Pour la majorité des biopolymères, la température et les ions sont les principaux agents gélifiants.

- La gélification ionique s'effectue par diffusion d'ions d'une solution liquide vers les gouttes d'hydrogel engendrant une réticulation rapide du biopolymère. La rapidité de la réticulation rend compatible l'utilisation de ces biopolymères avec la méthode de dripping. Les gouttes produites sont récupérées dans un bain aqueux et gélifient quasi-instantanément sans se dissoudre au sein du milieu. Nous verrons un exemple Section 4.2.3.1.
- La gélification des hydrogels activée par changement de température s'effectue par réorganisation des molécules de l'hydrogel et assemblage en agrégats polymériques solides. Un exemple sera présenté Section 4.1.2. Ce processus est lent et nécessite quelques minutes afin de former une structure solide. Pour les biopolymères gé-

lifiant thermiquement (collagène, agarose, gélatine, élastine), le transfert dans un bain aqueux à la température de polymérisation provoquera la dissolution des gouttes avant gélification. L'utilisation de tensio-actifs peut éviter aux gouttes de se dissoudre mais les tensio-actifs sont des paramètres difficiles à ajuster et peuvent présenter des effets néfastes sur les cellules.

Les techniques de dripping sont ainsi plus adaptées pour les hydrogels gélifiant par diffusion ionique (alginate, chitosane). Les techniques microfluidiques produisent des gouttes au sein d'une phase continue non miscible et peuvent être gélifiées dans cette phase avant d'être récupérées dans un bain aqueux. La technique microfluidique est alors compatible avec les hydrogels gélifiant thermiquement. Des composants ioniques peuvent également être intégrés dans les circuits microfluidiques afin de gélifier les hydrogels type alginate et chitosane. La technique d'encapsulation microfluidique est ainsi compatible avec l'ensemble des procédés de gélification et donc avec l'ensemble des biomatériaux utilisés en ingénierie tissulaire.

4.1.2 Le biomatériau utilisé : le collagène

Les polymères synthétiques présentent généralement des limitations en terme de biotolérance et des effets cytotoxiques sur les cellules [11, 286]. De plus, ils ne présentent pas de sites d'adhésion cellulaire et des modifications doivent être effectuées afin de permettre l'accroche de cellules à leur surface. Pour ces raisons, les biomatériaux naturels sont généralement utilisés pour des applications d'encapsulation cellulaire. Plusieurs informations sur l'encapsulation à l'aide de polymères synthétiques peuvent être trouvées dans la revue de Olasibi [287]. Dans le cadre de la thèse, nous décidons d'utiliser uniquement des biomatériaux naturels qui présentent de meilleures propriétés de biocompatibilité et de cytotoxicité.

Le collagène est le composant majoritaire des tissus animaux. C'est un biomatériau biocompatible largement utilisé pour des applications de vascularisation *in vitro* [288]. Le collagène fournit un environnement idéal aux cellules dans lequel les cellules peuvent remodeler la matrice et s'auto-arranger [289, 290, 291]. De plus, le collagène possède des sites d'adhésion cellulaire, ce qui représente une propriété essentielle pour notre application de recouvrement des microsphères par des cellules endothéliales. Pour ces raisons, nous décidons d'utiliser ce biomatériau en tant que composant d'encapsulation.

4.1.2.1 Structure du collagène

Le collagène est la protéine la plus présente de la matrice extracellulaire des organismes animaux. La famille des protéines de collagène est large : plus de 30 types de collagène ont été identifiés, chacun possédant une fonction biologique unique.

La caractéristique commune de tous les collagènes est leur structure sous forme d'une hélice composée de trois chaînes polypeptidiques α [292] (Figure 4.4). Une chaîne α est

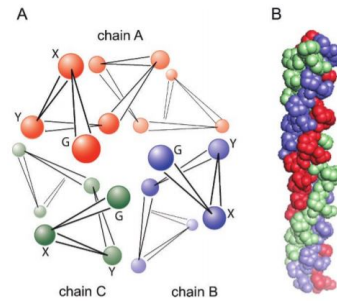


FIGURE 4.4 – Structure en triple hélice de la molécule de collagène. [295]
 (A) Vue axiale de l'hélice montrant les résidus glycines enfouis au centre de la triple hélice.
 (B) Vue de côté de la triple hélice.

caractérisée par la répétition d'une séquence de trois acides aminés : Gly-X-Y où X et Y peuvent être n'importe quel acide aminé. Parmi tous les collagènes, le collagène de type I représente 90% des collagènes et est la protéine structurale la plus abondante des tissus biologiques ce qui explique son utilisation dans de nombreux développements d'ingénierie tissulaire. Dans le cas du collagène de type I, X et Y sont le plus souvent les résidus proline et hydroxyproline et constituent environ 30% de la chaîne [293]. Le collagène de type I est composé de 3 chaînes polypeptidiques : deux chaînes $\alpha 1$ et une chaîne $\alpha 2$. Il est à noter que la configuration exacte de la molécule de collagène n'a jamais été résolue. L'hypothèse de la structure en triple hélice a été proposée par Ramachandran et son équipe et n'a depuis jamais été réfutée [294].

4.1.2.2 Fibrillogenèse du collagène

La particularité principale du collagène de type I réside dans sa capacité à former spontanément des fibrilles sous des conditions physiologiques. Les molécules de collagène sont stables à basse température dans des solutions acides et forment des fibrilles de collagène dans des conditions physiologiques (pH = 7.4 & T = 37°C). Le processus d'assemblage des molécules de collagène produisant des fibrilles de collagène est appelé fibrillogenèse. La fibrillogenèse reste un processus toujours mal compris [296].

La formation de fibrilles peut être suivie par mesure de l'évolution de la turbidité au cours du temps [297]. En effet, lors du développement de fibrilles, le grossissement des fibres peut être détecté et la turbidité du milieu augmente. La courbe classique d'évolution de la turbidité lors de la cinétique de fibrillogenèse est montrée Figure 4.5. Cette sigmoïde caractérise la cinétique de développement des fibrilles. Les courbes turbidimétriques révèlent une phase de retard, puis une croissance et l'atteinte d'un plateau [298]. Le profil en forme de sigmoïde suggère que la fibrillogenèse est un phénomène de nucléation et croissance, similaire à celui d'une cristallisation [299].

A partir des données turbidimétriques combinées à des mesures de viscosité et de microscopie électronique, Gelman *et al.* [301] ont proposé un mécanisme d'assemblage des

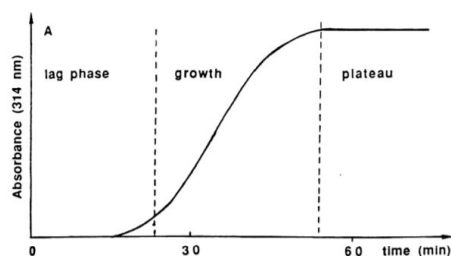


FIGURE 4.5 – Courbe classique de turbidité montrant la cinétique de formation de fibrille du collagène. [300]

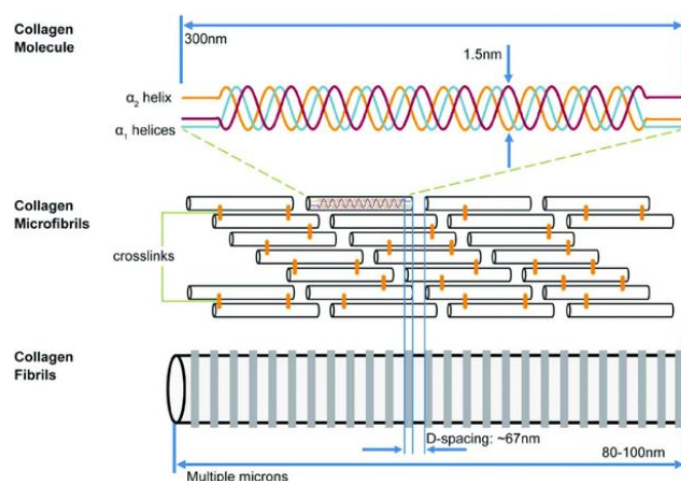


FIGURE 4.6 – Biosynthèse des fibres de collagène de type I. [302]

molécules de collagènes en fibrilles en 3 étapes (Figure 4.6) :

- La première étape consiste en l’assemblage latérale de 5 à 17 molécules de collagène, formant des microfibrilles (57, 58). Cette étape est dépendante de la température et le processus est guidé par l’entropie (60).
- La deuxième étape est indépendante de la température et consiste en l’association linéaire des microfibrilles. Les filaments croissent linéairement. Cette étape se déroule durant la phase de latence.
- Lors de la troisième étape, les filaments de microfibrilles s’assemblent maintenant latéralement. Le diamètre des fibrilles en formation augmente alors et permet la détection par turbidimétrie. Cette étape se déroule lors de la phase de croissance. L’association latérale des filaments est dépendante de la température.

La longueur des fibrilles de collagène de type I varie de 500 nm jusqu’à 1 cm de longueur. Une caractéristique des fibrilles de collagènes de type I est le décalage longitudinal dans l’assemblage des molécules de collagène d’un espace de 67 nm [303]. Pour plus de précisions sur la structure et la formation des fibrilles de collagène, il est possible de se référer à la thèse de Gobeaux et celle de Portier [304, 305].

Paramètres influençant la fibrillogenèse

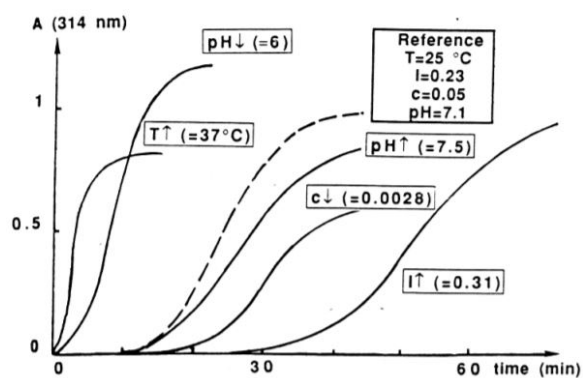
Dans notre cas où l'on souhaite former des microgouttes de collagène puis gélifier les structures, le paramètre important à extraire des sigmoïdes caractérisant la cinétique de fibrillogenèse est le temps de gélification, temps auquel la sigmoïde atteint le plateau.

La fibrillogenèse est un processus qui dépend de plusieurs paramètres parmi lesquels le pH, la température et les forces ioniques [306, 307, 308, 309]. L'influence de chaque paramètre est généralement étudiée par analyse des différentes courbes de turbidimétrie obtenues sous différentes conditions. Djabourov *et al.* ont notamment regardé l'impact du pH, de la température, et de la concentration sur la cinétique de gélification du collagène [300]. En fixant des paramètres de gélification de référence et en modifiant ensuite chaque paramètre individuellement, ils ont déduit qu'une augmentation de la température et une diminution du pH accélèrent le processus de gélification (Figure 4.7a). De même, une diminution de la concentration réduit le temps nécessaire à la formation de fibrilles de collagène. Zhu *et al.* ont également montré qu'une augmentation de la concentration et de la température réduisait le temps de gélification [310] (Figure 4.7b). Leur mesure est effectuée par CRM (pour Confocal Reflectance Microscopy) permettant de détecter la formation de fibrilles de collagène.

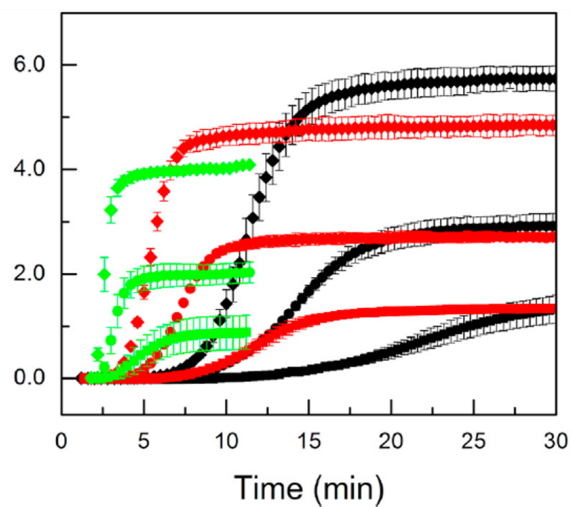
La provenance du collagène a aussi son importance sur la formation de fibrilles de collagène. Il est possible d'extraire directement le collagène d'animaux comme la queue de rat ou la peau de veau. Dans notre cas, nous utilisons des solutions de collagène provenant de queue de rat disponibles commercialement. Kreger *et al.* ont comparé les cinétiques de polymérisation de différents collagènes commerciaux avec leur formulation de collagène extraite de la peau de porc [311]. Dans leur condition, le collagène provenant de BD Biosciences© présente la vitesse de gélification la plus courte (Figure 4.8). C'est le collagène que nous utiliserons lors de cette thèse.

4.1.2.3 La production de microsphères de collagène dans la littérature

Plusieurs équipes ont publié sur la production de microsphères de collagène. Une liste non-exhaustive de ces publications est détaillée dans la Table 4.1. Sur l'ensemble des publications étudiées, plusieurs publications produisent des microsphères de collagène à l'aide d'un dispositif microfluidique, mais chacune utilise des tensioactifs dont nous souhaitons nous abstenir. Plusieurs publications utilisent également de l'alginate en tant que gélifiant rapide afin de laisser le temps au collagène de gélifier dans un second temps.



(a) Effet du pH, de la température, des forces ioniques et de la concentration. [300]



(b) Impact de la température et de la concentration. La concentration varie entre 0.5 mg/mL (carré), 1 mg/mL (rond) et 2 mg/mL (diamant) et la température entre 27°C (noir), 32°C (rouge) et 37°C (vert). [310].

FIGURE 4.7 – Influence de différents paramètres sur la cinétique de fibrillogenèse.

Tableau 4.1 – Différentes études produisant des microsphères contenant du collagène.

Technique de production	Composition des microsphères	Huile	Gélicification	Taille des microsphères	Cellules encapsulées	Remarque	But de l'étude	Référence
MFFD plan	Cœur de collagène (0,5-5mg/mL) Membrane d'alginate (2%)	Minérale + 1,2% Span80 + émulsion CaCl ₂	30min à 37°C	381 ±34µm Cœur : 285 ±80µm	mESCs	Ajout de 1% sodium carboxyméthyl cellulose pour éviter mélange collagène / alginate	Formation de tissus 3D	[312]
MFFD plan	Collagène (3,5mg/mL)	Minérale + 2% Span80	Huile à 40°C	50-300µm	MDA-MB-231		Formation de tissus 3D	[313]
MFFD plan	Cœur de collagène (1,4mg/mL) - Matrigel - alginate Membrane d'alginate	Minérale + 0,35g Span80 + 35µL acide acétique	37°C	312 ±13µm Cœur : 191 ±18µm	MCF-7		Formation de sphéroïdes tumoraux	[314]
MFFD plan	Collagène (0,25mg/mL) + alginate (1%)	HFE-7500 + 1% Pico-surf TM2		200µm	Hep G2	Cisaillage par huile + tensioactif et double encapsulation par du milieu de culture + 2,5%wt de Pluronic127 Evaporation de l'huile par contact avec l'air en 4h	Formation de sphéroïdes d'hépatocytes	[315]
MFFD jonction-T	Collagène (2mg/mL)	Mais + 2% lecithin	30min à 37°C	175 ±9µm	Detroit 551 HEP G2 MDA-MB-231	Production => gélicification => passage dans hexadecane + 2% Span80 => 3x lavage au PBS +0,2% Tween20 => passage PBS	Analyse interaction ECM-cellules	[316]
MFFD jonction-T	Collagène (2mg/mL)	Silicone	T ambiant	120µm	MDA-MB-231		Formation de tissus 3D Etude de la migration cellulaire	[317]
MFFD asymétrique	Collagène (2,4mg/mL)	Mais + 2% lecithin + paraffin liquide + 2% Span80	15min à 37°C	101-237µm (CV<5%)	NHEKs NHDFs	Production => gélicification => passage dans hexadecane + 2% Span80 => 3x lavage au PBS +0,2% Tween20 => passage PBS	Formation de microtissus de peau	[318]
MFFD asymétrique	Collagène (2mg/mL)	Mais + 2% lecithin	45min à 37°C	116 ±6µm	NIH-3T3 Hep G2 HUVECs MIN6m9	Production => gélicification => passage dans hexadecane + 2% Span80 => 3x lavage au PBS +0,2% Tween20 => passage PBS	Construction de tissus macroscopiques	[258]
MFFD asymétrique	Collagène (3,5mg/mL)	Minérale + 2% Span80	Cross-linking par EDC-NHS	332 ±48µm	HEP G2 HUVECs	3x Lavage dans éthanol puis centrifugation 10min à 3500rpm => transfert en PBS	Formation de tissus 3D	[319]
Formation de sphéroïdes	Cellules + recouvrement collagène (1,2mg/mL)			45-300µm	HEP G2 HUVECs		Formation de tissus de foie vascularisé	[320, 321]
Dripping	Collagène (5mg/mL) + alginate comme support sacrificiel		Calcium + 10min à 37deg	100µm	NIH-3T3	Etape de recouvrement avec poly-L-lysine pour évacuer alginate	Formation de microtissus 3D	[322]
Dripping	Collagène + alginate comme support sacrificiel		Calcium + 3h à 37°C	300-500µm	C2C12	Etape de recouvrement avec L-lysine pour évacuer alginate	Formation de tissus 3D	[323]
Dripping	Collagène	Mais + Pluronic127	45min à 37°C	70-260µm	NIH-3T3	Chute des microsphères dans bain Pluronic127 sur lequel repose une fine couche d'huile mais	Formation de tissus 3D	[324]
Dripping	Cœur de collagène Membrane d'alginate		Calcium	250µm Cœur : 150µm	mESCs		Etude différenciation mESCs	[325]
Emulsion	Collagène (4mg/mL) + fibrin (4mg/mL)	PDMS froid	25min à 37°C	50-300µm	HUVECs NHLF		Vascularisation	[326, 327]
Emulsion	Collagène (4mg/mL) + agarose (2%)	PDMS froid	6min à 37°C + 30min à 4°C	70-100µm	hMSCs		Etude des hMSCs	[328]

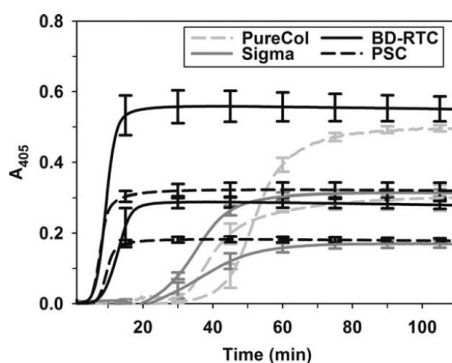


FIGURE 4.8 – Comparaison de la cinétique de polymérisation de différents collagènes commerciaux et du collagène produit dans la publication pour des concentrations de 0.5 mg/mL (courbe du bas) et 1.0 mg/mL (courbe du haut). [311]

4.2 Production de microsphères de collagène par la technique microfluidique

Nous souhaitons produire des microsphères de collagène. Du collagène de type I provenant de queue de rat obtenu commercialement est utilisé. Ce collagène est reçu sous forme soluble à des concentrations comprises entre 8 et 11 mg/mL et un pH proche de 2. Les molécules de collagène sont stables en solution acide et à une température de 4°C. Lorsque la solution de collagène est neutralisée (pH = 7.4) et chauffée à 37°C, les molécules de collagène s'assemblent et développent des fibrilles de collagène selon le processus détaillé Section 4.1.2.2. En suivant le protocole du fabricant, l'hydrogel est préparé en diluant la solution initiale de collagène dans du PBS 1X, du NaOH et de l'eau distillée. Le NaOH est ajouté pour ajuster le pH de la solution et l'eau distillée afin d'ajuster la concentration. Le PBS est ajouté à 1/10ème du volume finale. Nous souhaitons préparer des microsphères à la concentration la plus élevée, afin d'augmenter la rigidité des microsphères produites. Comme la concentration des solutions mères varie entre chaque lot, nous préparons les solutions de collagène à une concentration finale de 6 mg/mL afin que la concentration soit identique pour chaque expérience et quelque soit le lot reçu.

Il est important de noter qu'une fois la solution de collagène neutralisée, les molécules de collagène s'assemblent en microfibrilles, même à 4°C. Le chauffage de la solution à 37°C permet l'assemblage latérale des microfibrilles afin de former des fibrilles de collagène au diamètre plus épais. Si la solution neutralisée de collagène est laissée à 4°C, les molécules de collagène s'assemblent en microfibrilles et forment des filaments de microfibrilles durant la phase de latence, selon le modèle de gélification proposé par Gelman *et al.* [301]. Cependant, la phase de croissance durant laquelle les filaments de microfibrilles s'associent latéralement pour former les fibrilles de collagène au diamètre plus large, n'a pas lieu. Les microfibrilles s'accumulent alors et forment des agrégats. Un gel mou de microfibrilles de collagène est alors obtenu formé par des agrégats de longs filaments de microfibrilles. Nous souhaitons produire des microsphères de collagène les plus rigides possibles, c'est

pourquoi les microsphères doivent être chauffées à une température de 37°C après production. Lors de l'expérience de production, la solution de collagène est neutralisée puis les microsphères sont produites. Ainsi, la production des microsphères doit s'effectuer rapidement à 4°C avant la formation d'agrégats de microfibrilles qui empêchent la production des microsphères.

4.2.1 Système de production

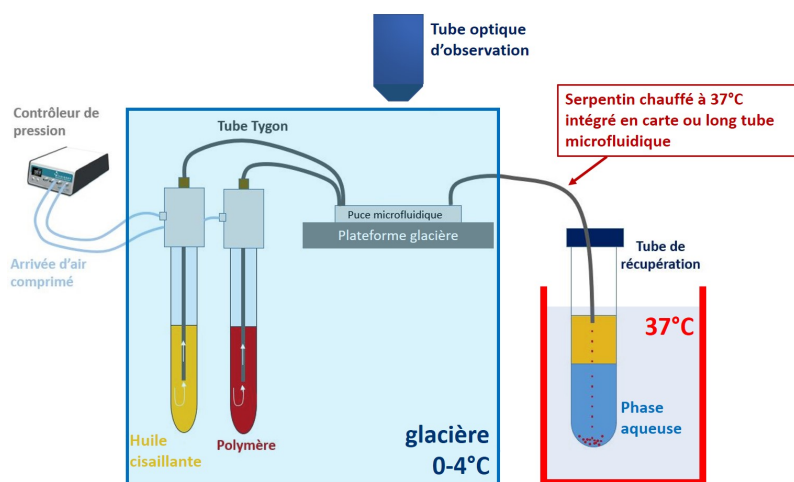
Afin de produire des microsphères, il faut que l'hydrogel de collagène reste liquide. Ainsi, les gouttes de collagène doivent être formées à 4°C, puis chauffées dans un second temps à 37°C. Pour cela, le dispositif MFFD de production de microsphères, utilisé classiquement avec de l'alginate, est adapté pour une utilisation avec du collagène (Figure 4.9a). Le dispositif microfluidique de production est intégré au sein d'une enceinte réfrigérée et le contenant de récupération de microsphères est placé au sein d'un bain-marie à 37°C (Figure 4.9b). Ainsi, le collagène reste liquide le temps de la production des microsphères. L'huile utilisée afin de cisailer la phase dispersée de collagène est également placée dans la glacière (Figure 4.9c).

4.2.1.1 Production des microgouttes

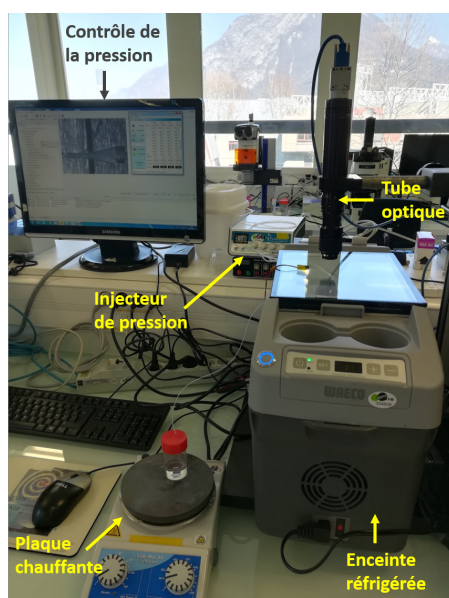
Après neutralisation, le collagène est placé dans l'enceinte réfrigérée et injecté au sein de la carte microfluidique contenant le motif MFFD. Le collagène constitue la phase dispersée et l'huile cisailante la phase continue. Basée sur son utilisation dans de nombreuses publications de formation de microgouttes en microfluidique, de l'huile minérale est utilisée. Le débit des fluides est contrôlé à l'aide d'un générateur de pression Fluigent. La production des gouttes dépend du débit de chaque phase. Nous contrôlons le débit dans chaque canal à l'aide d'un générateur de pression appliquant une pression au niveau des tubes d'injection. Le débit imposé dépend de la pression appliquée et de la résistance hydraulique du circuit. Pour chaque expérience, le diamètre et la longueur des tubes d'injection et de récupération, ainsi que l'architecture microfluidique sont conservés afin de garder fixe la résistance hydraulique de notre circuit. De cette manière, la pression injectée est directement liée au débit imposé. Le rapport des pressions appliquées à chaque phase est un paramètre déterminant de la formation des gouttes.

Nous souhaitons nous placer dans le régime goutte-à-goutte présenté Figure 4.3, car il offre un meilleur contrôle sur la formation des gouttes et une monodispersité des microsphères augmentée. Une pression trop importante appliquée sur la phase continue, vis-à-vis de la phase dispersée empêchera la phase dispersée d'avancer et empêchera ainsi la formation de gouttes. A l'inverse, une pression appliquée à la phase dispersée trop importante par rapport à celle de la phase continue nous placera dans le régime de jet. Pour un polymère et une carte microfluidique MFFD donnés, il est possible de tracer un diagramme de phase montrant les pressions limites à appliquer afin de se placer dans le régime goutte-à-goutte.

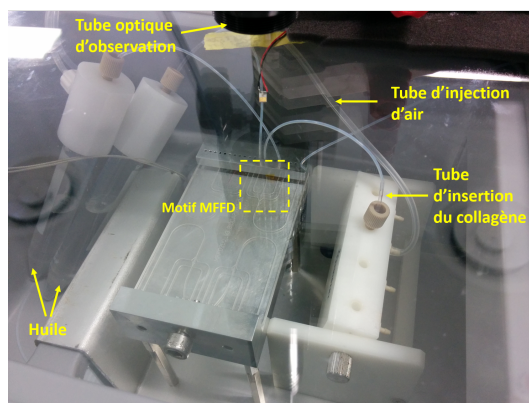
Au sein de notre carte microfluidique MFFD, le diagramme de phase de la production de microgouttes de collagène à 6 mg/mL a été tracé (Figure 4.10). L'espace entre les deux



(a) Schéma du montage



(b) Photographie du banc expérimental



(c) Vue de l'intérieur de la glacière

FIGURE 4.9 – Montage expérimental pour la production de microsphères de collagène.

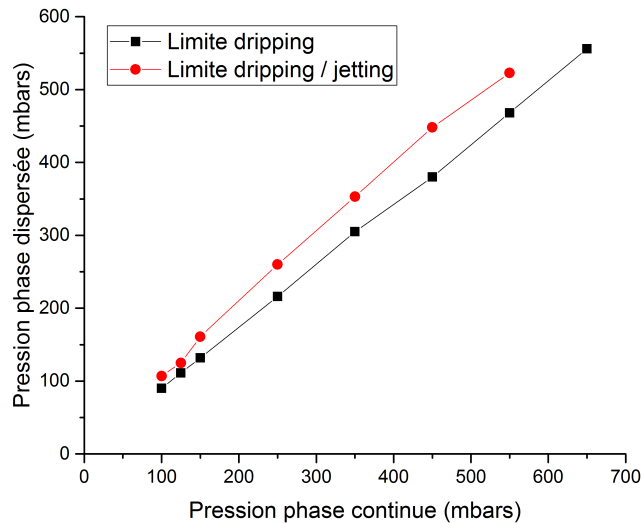
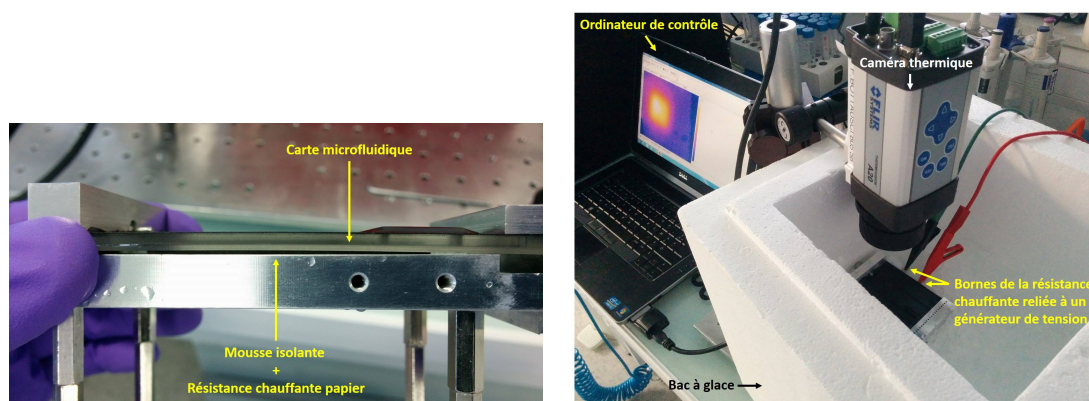


FIGURE 4.10 – Diagramme de phase pour la production de microsphères de collagène à 6 mg/mL.

les courbes indiquent les rapports de pression pour lesquels des gouttes sont produites dans le régime goutte-à-goutte. La courbe de limite de dripping indique le rapport de pression séparant le régime de non-production de gouttes et le régime goutte-à-goutte. La courbe de limite dripping-jetting indique le rapport de pression séparant le régime goutte-à-goutte et le régime de jet. Ces deux courbes sont proches, ce qui est caractéristique des liquides à faible viscosité. Ainsi, les pressions appliquées doivent être précises afin de former des microgouttes monodisperses de collagène.

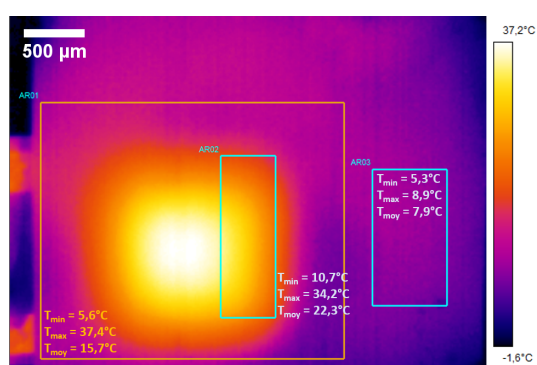
4.2.1.2 Gélification des microgouttes de collagène

Lorsque les microgouttes sont produites, la gélification doit être initiée par chauffage à 37°C. Nous décidons de développer un système permettant la gélification directement au sein de la carte microfluidique de production des microgouttes. En sortie du motif MFFD, un serpentin est usiné pour augmenter le temps de résidence des gouttes dans la carte. La phase continue d'huile minérale transporte ainsi les microgouttes de collagène et circule dans le serpentin. Une résistance chauffante est placée sous ce serpentin afin d'induire un chauffage local de la carte au niveau du serpentin (Figure 4.11). Une résistance chauffante papier conçue au sein de notre laboratoire est utilisée. Une tension est appliquée au borne de cette résistance afin de générer un chauffage de la résistance, et donc de la carte microfluidique au niveau du serpentin. La température à appliquer à la résistance chauffante afin de générer une température de 37°C sur la paroi opposée de la carte microfluidique a été mesurée (Figure 4.11b). Les résultats obtenus (Figure 4.11c), combinés à une simulation numérique sous Comsol (Figure 4.11d), ont permis de paramétrer le

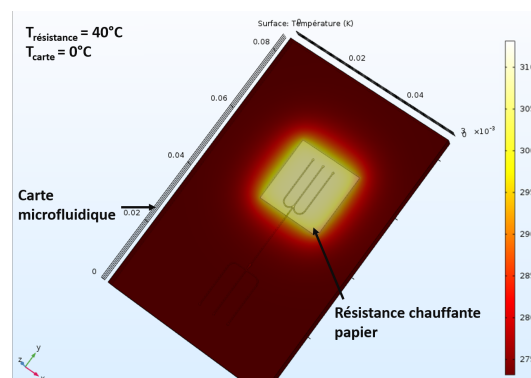


(a) Montage de mesure thermique.

(b) Vue latérale du support et de la carte.



(c) Mesure de la diffusion thermique au sein de la carte microfluidique pour 1h30 de chauffage à 8V.



(d) Simulation de la diffusion thermique au sein de la carte microfluidique.

FIGURE 4.11 – Mesure de la température au sein de la carte microfluidique placée dans un bac à glace et chauffée localement à l’aide d’une résistance papier chauffante.

voltage à appliquer à la résistance thermique. Ces résultats nous ont également permis de confirmer que le chauffage local de la carte microfluidique ne générerait pas un réchauffement de toute la carte microfluidique, notamment au niveau du motif MFFD de production de microgouttes. En effet, sur la Figure 4.11d, on observe que la température moyenne au niveau du rectangle de droit est de 8°C et réduit lorsque l’on s’éloigne de la résistance chauffante. Le serpentin est alors usiné le plus loin possible du motif MFFD afin d’éviter une gélification prématurée de la phase dispersée avant production des microgouttes.

Avant de produire les microsphères de collagène, nous déterminons le temps de gélification nécessaire à la gélification du collagène que nous utilisons. Pour cela, nous mesurons l’absorbance d’une solution de collagène durant la cinétique de gélification, comme présentée section 4.1.2.2. La courbe d’absorbance est montrée Figure 4.12. On observe la sigmoïde caractéristique de la gélification du collagène avec une phase de latence d’environ 6-7 minutes, puis une phase de croissance rapide atteignant un plateau au bout de 12 minutes. On en déduit qu’un chauffage à 37°C d’au minimum 12 minutes est nécessaire

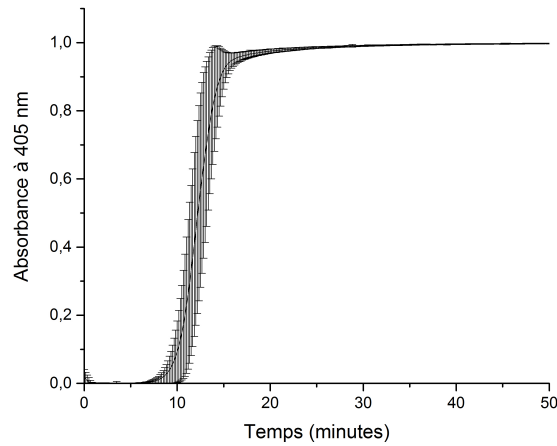


FIGURE 4.12 – Cinétique de gélification du collagène à 6 mg/mL à 37°C (n=9).

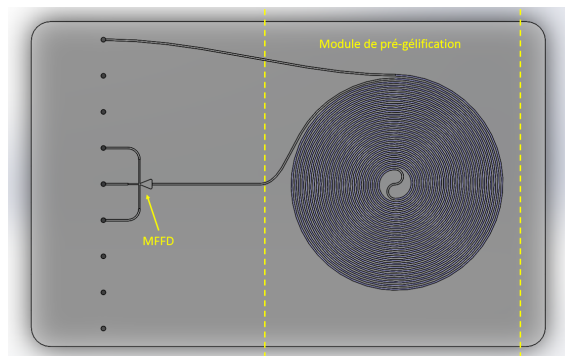


FIGURE 4.13 – Carte microfluidique de production de microsphères de collagène.

afin de gélifier les microsphères de collagène. La taille du serpentin conçu et les débits appliqués sont déterminés de sorte à chauffer les microsphères pendant une durée suffisante.

Une vue de dessus de la carte microfluidique intégrant le module de production des microsphères et le serpentin de gélification est présentée Figure 4.13.

4.2.2 Coalescence des microsphères de collagène

Des microgouttes de collagène ont été produites avec ce dispositif. Les microgouttes sont récupérées dans un contenant placé sur une plaque chauffante, ou dans un bain-marie, à 37°C afin de finaliser la gélification du collagène. Le contenant est rempli d'une solution aqueuse de PBS 10X sur laquelle repose de l'huile minérale (Figure 4.14a). Comme le collagène est plus dense que l'huile, les microsphères sédimentent et traversent l'interface. La faible taille de gouttes, de l'ordre de 250 μm , entraîne une sédimentation lente des microsphères. Néanmoins, les microsphères sont toujours chauffées à 37°C dans la phase

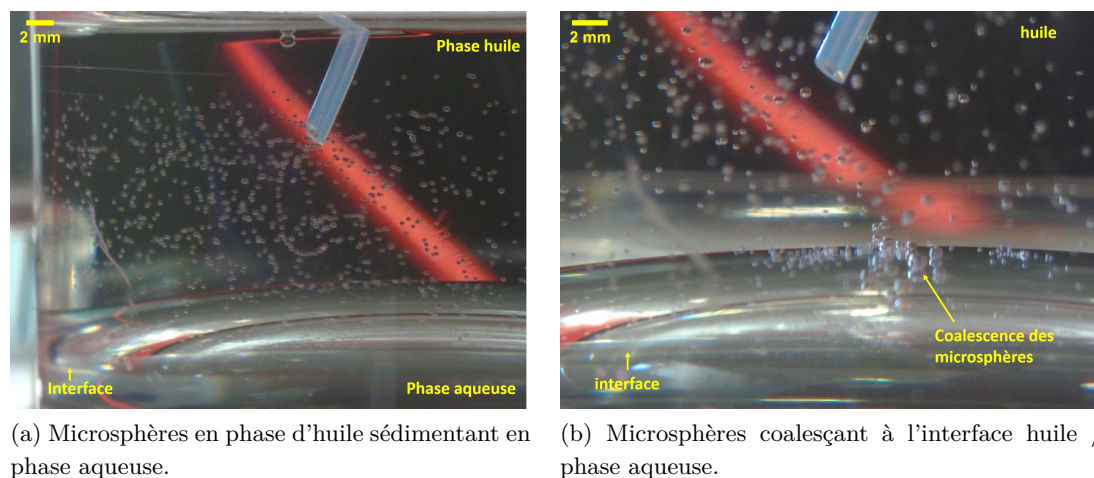


FIGURE 4.14 – Production des microsphères et coalescence à l'interface huile / bain aqueux.

d'huile ce qui permet de compléter la gélification.

Il est possible de suivre le trajet d'une microsphère de sa production jusqu'à sa sédimentation dans la phase aqueuse. Le temps de ce trajet est mesuré sur plusieurs microsphères à plus de 15 minutes. Néanmoins, nous observons une coalescence des microsphères qui s'accumulent à l'interface, avant de sédimenter en phase aqueuse (Figure 4.14b). Cette coalescence nous étonne car les microsphères devraient être gélifiées au moment de leur coalescence. De plus, en fin d'expérience, aucune microsphère de collagène n'est détectée dans la phase aqueuse. Nous pensons donc que les microgouttes de collagène n'ont pas gélifié et se sont dissoutes lors du transfert en phase aqueuse.

Afin de vérifier une potentielle inhibition de la gélification du collagène en phase d'huile, des gouttes de collagène de $50 \mu\text{L}$ sont produites à l'aide d'une pipette et gélifiées au sein d'un bain d'huile chauffé à 37°C avec une plaque chauffante. Les sphères semblent gélifiées au bout d'une heure car ces macrosphères peuvent être récupérées à l'aide d'une spatule et transférées en phase aqueuse sans observer de sédimentation des sphères.

Toujours dans l'optique de déterminer une potentielle inhibition de la gélification du collagène par l'huile, la cinétique de gélification de gouttes de collagène contenues dans un bain d'huile est mesurée. Ces cinétiques sont réalisées dans des plaques 96 puits. Trois puits sont pré-remplis avec $200 \mu\text{L}$ d'huile minérale puis $100 \mu\text{L}$ de collagène est pipeté dans chacun des puits. La plaque est alors placée dans une enceinte à 37°C et la mesure d'absorbance est réalisée. La courbe de gélification mesurée est présentée Figure 4.15. La courbe obtenue est à nouveau une sigmoïde, signe que le collagène a gélifié. Néanmoins, la sigmoïde est décalée comparée à celle obtenue pour du collagène à 6 mg/mL seul (Figure 4.12). Au sein d'un bain d'huile, le collagène semble mettre plus de temps à gélifier. Si l'on se fie à la courbe obtenue, au moins 25 minutes sont nécessaires afin de gélifier le collagène, contre 13 minutes mesurées précédemment (Figure 4.12). L'huile ralentit la gélification des

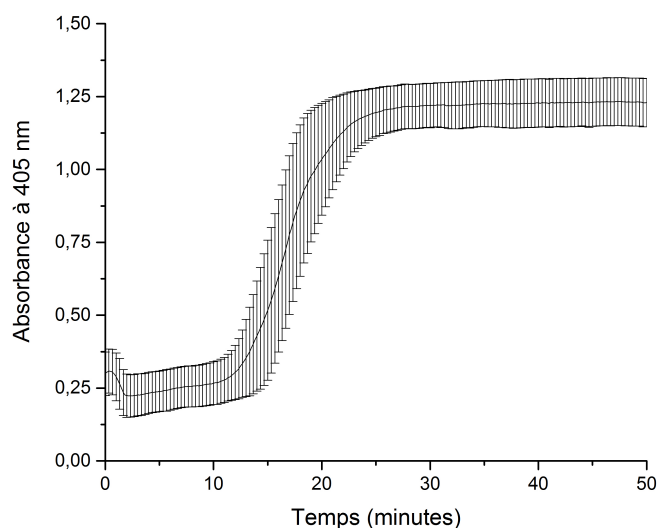


FIGURE 4.15 – Cinétique de gélification de 100 μL de collagène à 6 mg/mL dans 200 μL d'huile minérale, à 37°C (n=3).

microgouttes sans l'inhiber.

Afin d'éviter une sédimentation de la phase d'huile à la phase aqueuse avant gélification des microgouttes de collagène, la phase aqueuse est retirée. Les microgouttes sont produites et récupérées au sein d'un bain d'huile (Figure 4.16a). La taille du serpentín a été augmentée de sorte à ce que les microsphères gélifient dans la phase d'huile durant une heure. Des particules fluorescentes de 3 μm ont été ajoutées à la solution de collagène afin de mieux observer les microsphères. Une goutte macroscopique de 20 μL de collagène a également été formée à la pipette afin d'observer la gélification à l'oeil (Figure 4.16a). Il est intéressant d'observer l'apparition d'une pellicule d'eau à la surface de la macro-sphère de collagène au cours de la gélification (Figure 4.16b). La gélification du collagène s'accompagne d'un rejet d'eau des microsphères.

Concernant les microgouttes de collagène formées par le dispositif microfluidique, là encore, une coalescence des microsphères a été observée au cours de la gélification en phase d'huile. Cependant, lorsque l'on observe ces gouttes coalescées au microscope, les gouttes observées dans la phase d'huile sont en fait des gouttes aqueuses contenant les microsphères de collagène (Figure 4.16c). Il est difficile de distinguer les microsphères de collagène en lumière blanche, mais l'observation de la fluorescence des microparticules injectées dans le collagène révèle la présence de microsphères gélifiées dans une goutte d'eau (Figure 4.16d). Les microsphères sont soit séparées les unes des autres (Figure 4.16d), soit en agrégats (Figure 4.17). Dans les deux cas, cela montre qu'il y a eu une gélification du collagène. Les agrégats montrent que la gélification n'était pas totale puisque les microsphères se sont collées les unes aux autres. Une pellicule d'eau se forme lors de la gélification du collagène

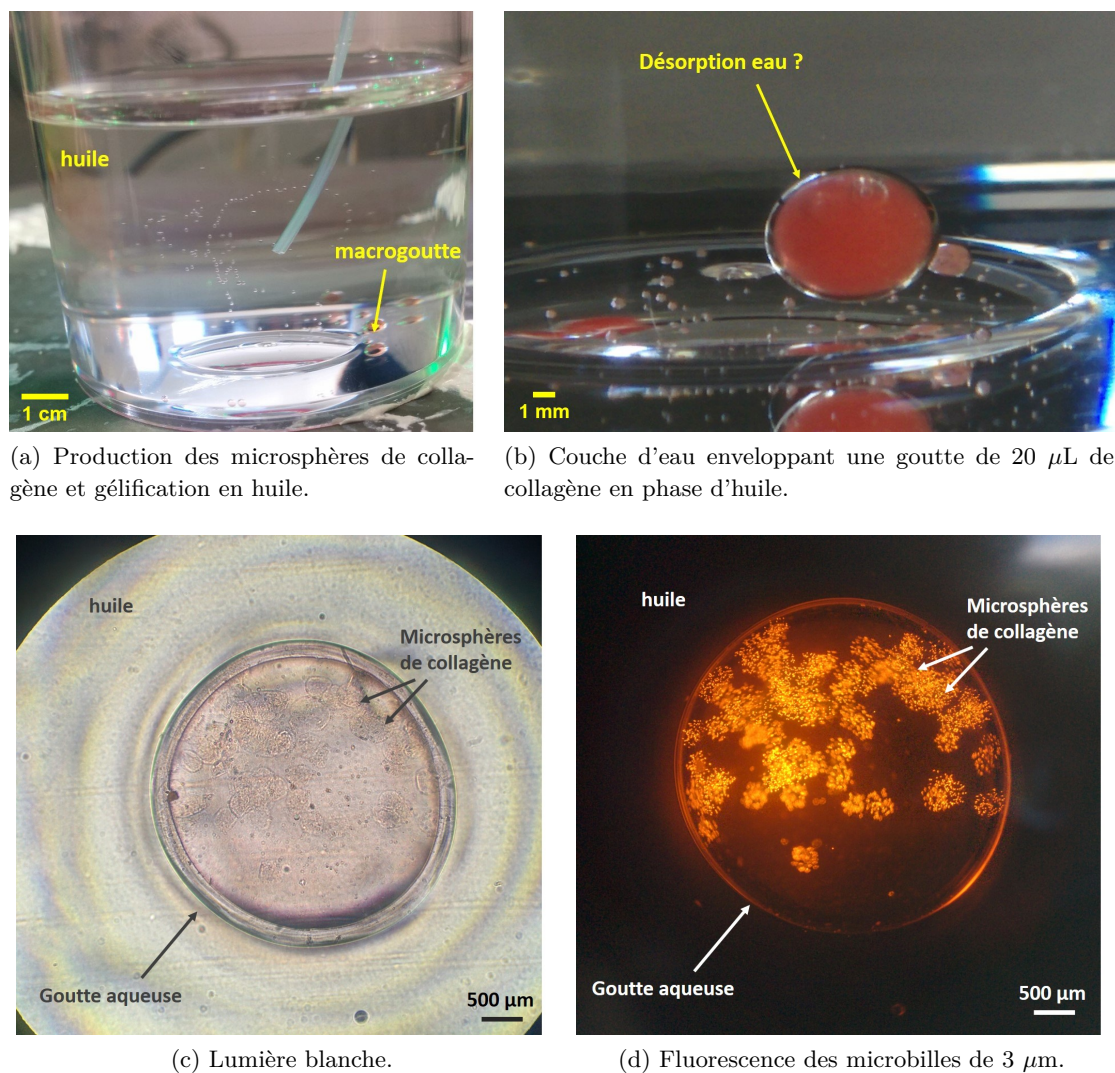


FIGURE 4.16 – Production des microsphères et gélification en phase d'huile

et enveloppe les microsphères. Lorsque ces gouttelettes d'eau rentrent en contact, elles coalescent. Si le collagène est complètement gélifié lors de la coalescence, il se forme une goutte d'eau avec des microsphères de collagène. Si le collagène n'est pas encore gélifié, il y a formation d'amas de microsphères de collagène.

Afin de récupérer les microsphères gélifiées unitairement en phase aqueuse, la phase d'huile est passée au travers d'un tamis. On peut voir Figure 4.18a une production de microgouttes de collagène où le collagène est directement gélifié en sortie de carte. En effet, les microsphères forment des agglomérats en sortie de tube au niveau de la phase d'huile. Cependant, les microsphères ne forment pas une seule et même goutte, comme cela serait le cas pour une accumulation de microgouttes aqueuses. Dans ce cas-ci, on

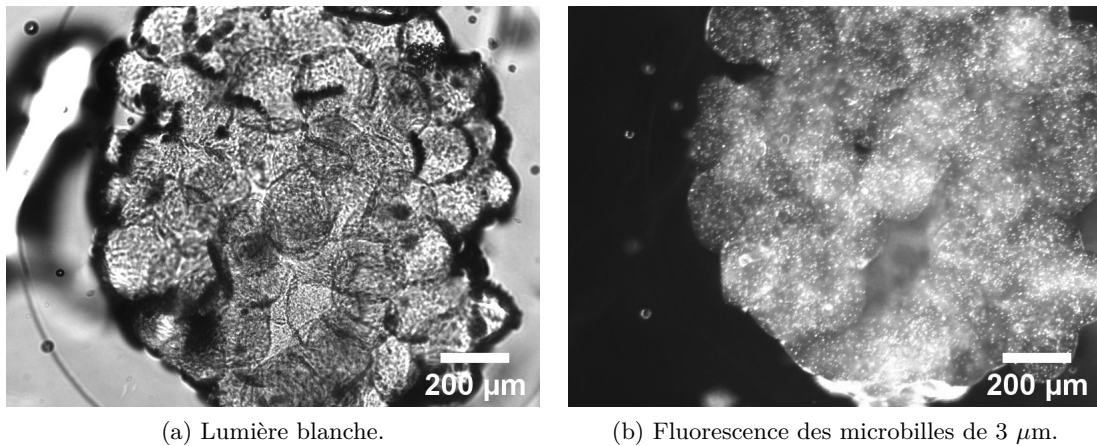
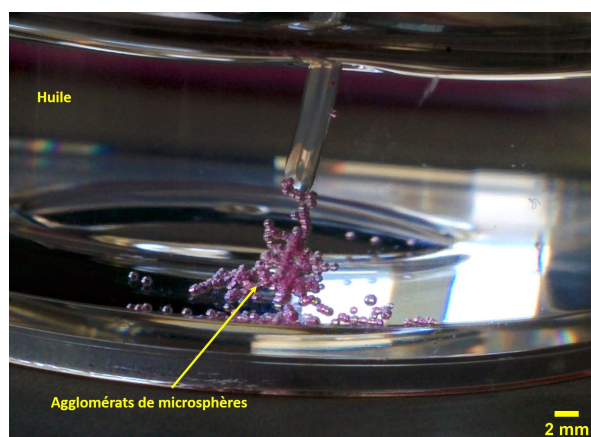


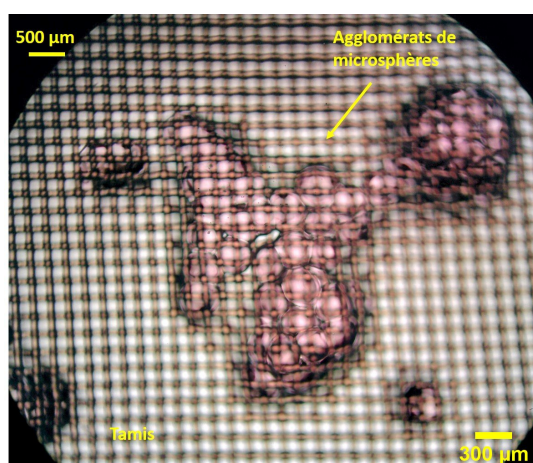
FIGURE 4.17 – Agglomération des microsphères en phase huile.

distingue bien les microsphères individuelles formant un agglomérat. Après la production, la phase d'huile est passée au travers d'un tamis. On observe les agglomérats de sphères en phase d'huile (Figure 4.18b). Du PBS10X est ensuite utilisé afin de rincer le tamis et placer les microsphères en phase aqueuse. Nous détectons difficilement les contours des microsphères en lumière blanche au sein d'une phase aqueuse (Figure 4.18c). La même expérience a été réalisée avec des microparticules fluorescentes mélangées préalablement dans la solution aqueuse de collagène, permettant de détecter les microsphères en phase aqueuse. Dans cette configuration, on distingue les particules fluorescentes contenues dans les microsphères (Figure 4.19a) et la microscopie fluorescente permet de dissocier les microsphères individuelles au sein d'un agglomérat (Figure 4.19b).

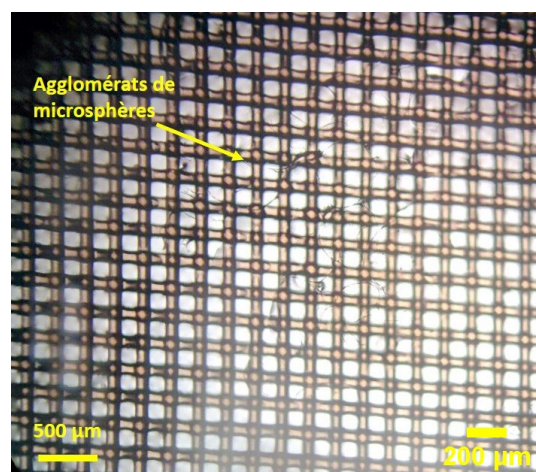
Les microsphères de collagène apparaissent donc être difficilement détectables en phase aqueuse. Il est ainsi possible que, lors de nombreuses expériences, des microsphères de collagène sédimentées en phase aqueuse ont pu être produites mais n'ont pas été détectées. Nous avons longtemps pensé, à tort, à une absence de gélification des microsphères de collagène dans de l'huile. Il apparaît que l'huile rallonge le temps de gélification nécessaire à la gélification du collagène, mais ne l'inhibe pas. Les microsphères en cours de gélification ont tendance à s'agréger et former des agglomérats de microsphères de collagène. Afin d'éviter l'apparition de ces agglomérats, il est possible de rallonger le temps de gélification en carte afin de gélifier totalement les microsphères individuelles dans la carte microfluidique, mais le rallongement des canaux microfluidiques s'accompagne de complications : théoriquement, les microgouttes produites circulant dans le canal microfluidique sont espacées les unes des autres et conservent leur distance. Dans les faits, les microgouttes ont tendance à se rejoindre dans les longs canaux microfluidiques et coalescent, formant des macrogouttes dont le diamètre est supérieur à la largeur des canaux. Ces coalescences de gouttes bloquent la production de microsphères et causent une coalescence de toutes les gouttes précédentes.



(a) Production des microsphères de collagène en phase huile.

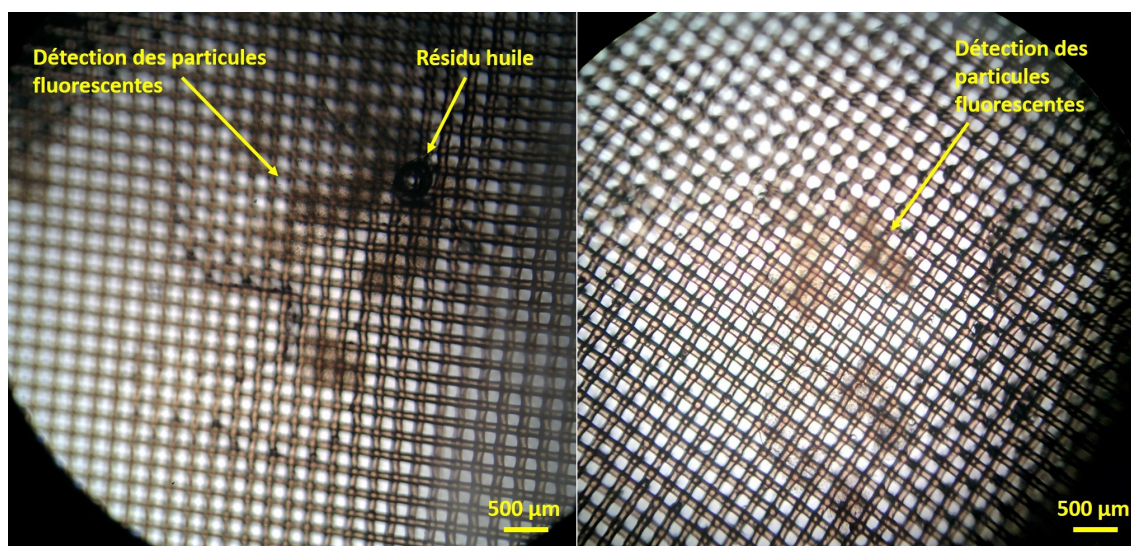


(b) Passage de l'huile au tamis.

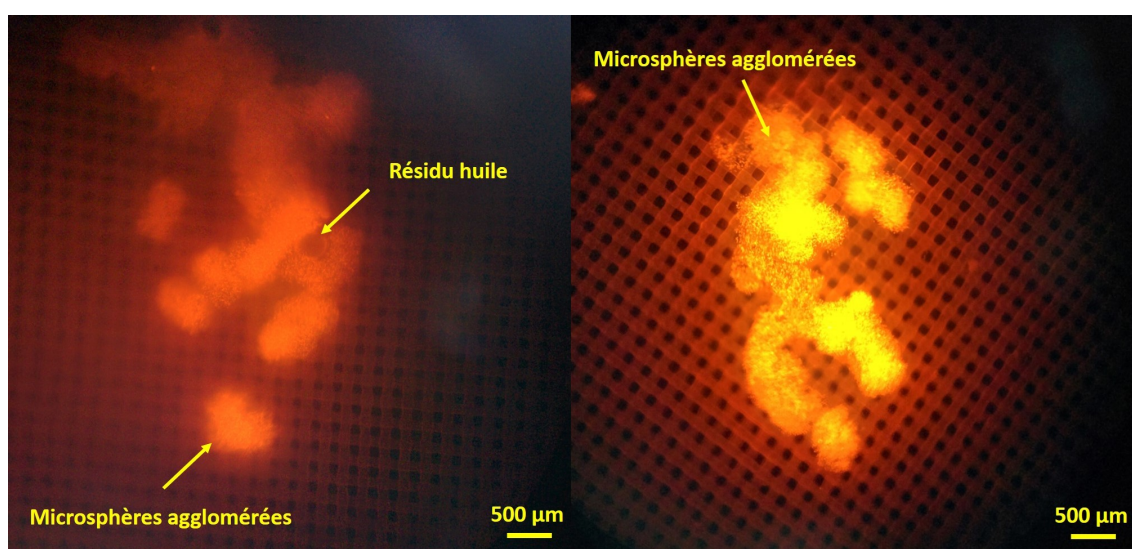


(c) Rinçage au PBS 10X.

FIGURE 4.18 – Production de microsphères de collagène en phase d'huile et passage au tamis.



(a) Microscope à transmission en lumière blanche.



(b) Fluorescence des microparticules de 3 μm .

FIGURE 4.19 – Microsphères de collagènes contenant des microparticules fluorescentes récupérées en phase aqueuse et passées au tamis.

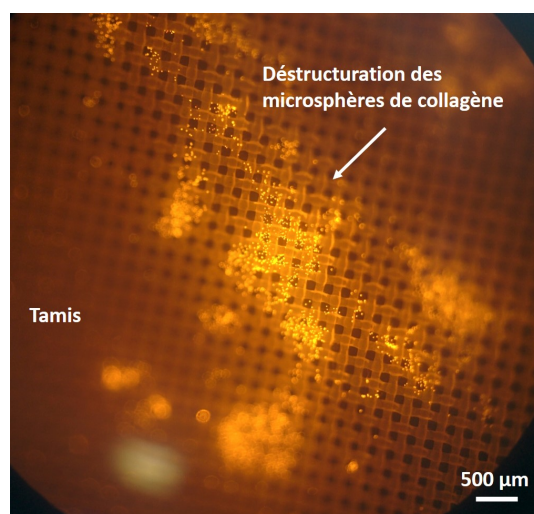


FIGURE 4.20 – Dissolution des microsphères de collagène après rinçage au PBS 10X.

Lors de certaines expériences où la production et gélification des microsphères sans apparition d'agrégats ont pu être effectuées, les microsphères ont été récupérées par passage de la phase d'huile au travers d'un tamis. Comme expliqué précédemment, le tamis est ensuite rincé avec du PBS. Dans de nombreux cas, le rinçage à l'aide du tamis a provoqué la déstructuration des microsphères de collagène (Figure 4.20). Les microsphères ne sont pas assez rigides afin de supporter l'étape de passage et rinçage au tamis. La faible rigidité des microsphères de collagène est un gros problème, étant donné l'application que nous souhaitons développer. Ces microsphères sont destinées à être empilées dans une chambre microfluidique par accumulation contre un filtre, à la manière de l'étape de transfert de la phase d'huile à la phase aqueuse. Si les microsphères se déstructurent lors de l'accumulation, l'architecture de l'empilement de sphères ne pourra être développée.

Le collagène présente de faibles propriétés mécaniques. C'est la raison pour laquelle dans le cadre d'applications à long terme, il est nécessaire de le coupler avec un agent de réticulation afin d'augmenter ses propriétés mécaniques. Cependant, l'agent de réticulation le plus utilisé dans ce contexte est le glutaraldéhyde, mais il provoque des réactions inflammatoires empêchant son utilisation dans des applications biologiques [329].

Le manque de rigidité du collagène causant la déstructuration des microsphères a déjà été observé par Yu *et al.* [314]. Dans leur publication, ils produisent des microsphères de collagène enveloppées dans une couche d'alginate. La couche d'alginate permet de gélifier rapidement la membrane contenant le collagène liquide et permet de laisser le temps au collagène de gélifier. Ils expliquent que de l'alginate a été ajouté au coeur de collagène des microsphères afin de rigidifier la microsphère. Sans cet ajout, les microsphères ne peuvent être centrifugées et séparées dans la phase d'huile sans causer de déstructuration. D'après Yu : "sans l'alginate présent dans le coeur des billes, les billes sont facilement rompues lors des étapes de lavage" [314]. Nous décidons donc d'appliquer la même stratégie, et

de produire des microsphères de collagène et d'alginate afin de rigidifier les microsphères. Cette technique a également été utilisée par Iacovacci *et al.* [20].

4.2.3 Utilisation de l'alginate pour la production de microsphères contenant du collagène

L'alginate est un hydrogel extrait d'algues brunes. Ce biopolymère présente de nombreuses caractéristiques intéressantes rendant favorable son utilisation pour des applications d'encapsulation cellulaire. Il est un composé hydrophile, constitué à plus de 98% d'eau et présente une bonne biotolérance et stabilité *in vivo*. L'alginate gélifie en conditions physiologiques par diffusion d'ions bivalents et la structure solide obtenue présente de bonnes propriétés mécaniques. Ces conditions de gélification sont facilement implémentables et compatibles avec la culture cellulaire. Enfin, l'alginate est disponible commercialement sous forme purifiée, en grande quantité et pour un coût modéré.

Ce matériau est souvent utilisé en tant que structure sacrificielle pour des applications d'ingénierie tissulaire ou en tant qu'enveloppe protectrice pour des applications d'encapsulation cellulaire [330]. L'alginate est un biomatériau biocompatible mais ne présente pas de sites d'adhésions pour les cellules. Les cellules n'interagissent pas avec le biopolymère. C'est pourquoi nous l'utilisons en mélange avec la solution de collagène, afin de produire des microsphères rigides contenant des sites d'accroche cellulaire. L'alginate permet de gélifier dans un premier temps l'alginate contenu dans les sphères ce qui permet de gélifier dans un second temps le collagène. Nous détaillons les procédés de gélification du collagène et de l'alginate dans les sections qui suivent.

4.2.3.1 Composition de l'alginate

L'alginate appartient à la famille des polysaccharides. Il est un copolymère composé de 2 monomères : l'acide β -D-mannuronique (M) et l'acide α -L-guluronique (G) (Figure 4.21a). Ces deux monomères se lient à eux-mêmes ou entre eux formant des blocs de monomères. On trouve ainsi les blocs M, les blocs G et les blocs MG (Figure 4.21b & c). Les chaînes d'alginate sont ainsi composées d'une alternance entre chacun de ces blocs. Chaque alginate diffère dans sa proportion en monomères M et G.

4.2.3.2 Gélification de l'alginate

Les chaînes de monomères M forment des structures étendues alors que les chaînes de monomères G forment des structures en "zig-zag". Pour ces blocs G, la structure zig-zag crée des cavités dans lesquelles un cation divalent peut s'insérer pour former une liaison ionique. L'insertion d'ions divalents au niveau de ces cavités, comme les ions Ca^{2+} , Ba^{2+} ou Sr^{2+} , forme des points de réticulation et permet de lier plusieurs chaînes de monomères entre elles (Figure 4.22). Ce modèle a été défini comme le modèle de boîte à oeuf [332].

La gélification de l'alginate s'effectue donc par formation de liaisons ioniques entre

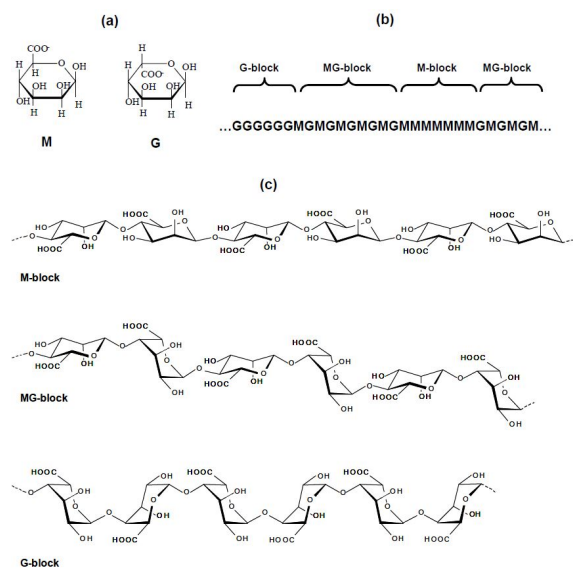


FIGURE 4.21 – Structure des monomères et des chaînes de monomères constituant l'alginate. [331]

(a) Illustration des deux monomères. (b) Chaîne des différents blocs de monomères. (c) Les différentes chaînes de monomères.

l'ion divalent au niveau des cavités des blocs G, puis par association latérale des chaînes de monomères. Un nombre minimum de motifs G adjacents, qui dépend du cation, permet d'obtenir une jonction stable. Pour le cation Ca^{2+} , ce nombre est de 8 à 20 motifs G successifs [333, 334]. Le processus de gélification est réversible si les ions divalents sont retirés du milieu aqueux. En revanche, le gel formé maintient sa structure tant que les ions sont toujours présents dans le milieu.

De nombreux cations peuvent permettre la réticulation des chaînes d'alginate. Cependant, les cations les plus utilisés pour des applications biologiques sont Ca^{2+} , Ba^{2+} ou Sr^{2+} car ils ne sont pas toxiques pour les cellules en faible quantité, contrairement aux cations Pb^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} Ni^{2+} et Zn^{2+} . Le cation Ca^{2+} est l'ion présentant le moins d'effet sur les cellules, c'est donc celui le plus utilisé pour effectuer une encapsulation cellulaire au sein de microsphères d'alginate.

Expérimentalement, la gélification de l'alginate est principalement réalisée par apport de calcium sous forme de sel soluble dans l'eau. Les gouttes d'alginate produites sont transférées dans une solution aqueuse contenant du chlorure de calcium (CaCl_2). Les ions calcium sont ainsi directement disponibles en solution ce qui permet la diffusion et la gélification de l'alginate [335, 336]. Cette technique permet de gélifier très rapidement l'alginate dans des conditions physiologiques (pH neutre & $T = 37^\circ\text{C}$).

L'alginate est le polymère naturel le plus utilisé dans des applications d'encapsulation

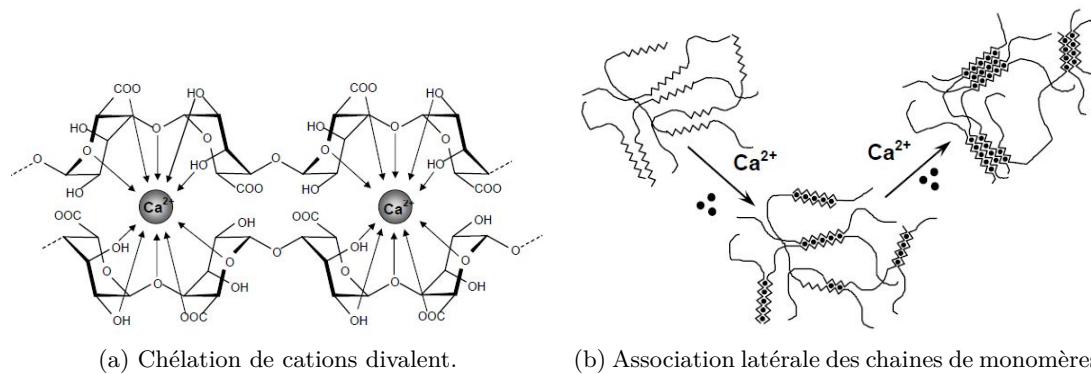


FIGURE 4.22 – Liaison d’ions divalents et des chaînes d’alginate selon le modèle de boîte à oeuf [331].

cellulaire pour la délivrance de principes actifs et la protection de cellules. Cependant, pour des applications de culture cellulaire et de formation de microenvironnement tissulaire, il est généralement couplé avec d’autres biopolymères afin de fournir une structure dans laquelle les cellules adhèrent, prolifèrent et remodelent l’espace de sorte à adopter leur configuration *in vivo*.

4.2.3.3 Production de microsphères de collagène et alginate

Les microsphères sont conçues à partir d’un mélange de collagène de type I et d’alginate SLM. On utilise la notation SLM_xCol_y afin de dissocier chaque mélange, x étant la concentration finale de l’alginate en pourcentage massique et y la concentration finale du collagène en mg/mL, conformément aux unités utilisées dans la littérature [337, 338]. Nous cherchons à produire des microsphères d’alginate - collagène contenant un maximum de points d’accroches, donc de collagène pour les cellules, et un maximum d’alginate afin d’augmenter la rigidité des microsphères. Le mélange SLM2-Col3 a ainsi été le mélange le plus utilisé pour la production de microsphères. Ces concentrations sont proches de celles utilisées par d’autres équipes pour la production de microsphères à partir d’un mélange d’alginate et de collagène [337, 338, 339]. D’autres concentrations de mélange ont parfois été utilisées ponctuellement.

Modification de l’architecture microfluidique

Afin de gélifier l’alginate, des ions calcium doivent être apportés. Pour cela, l’architecture microfluidique est modifiée (Figure 4.23). Un co-écoulement est généré en sortie du module de production des gouttes d’hydrogels. Deux canaux microfluidiques se ramifient au canal de sortie transportant les gouttes. Ces canaux sont perfusés par de l’huile pré-gélifiante : l’huile pré-gélifiante est de l’huile contenant des cristaux broyés d’acétate de calcium. Avec un mélange de collagène et d’alginate, de l’huile de soja est maintenant utilisée car le protocole de broyage des cristaux d’acétate de calcium au sein de cette huile est maîtrisé.

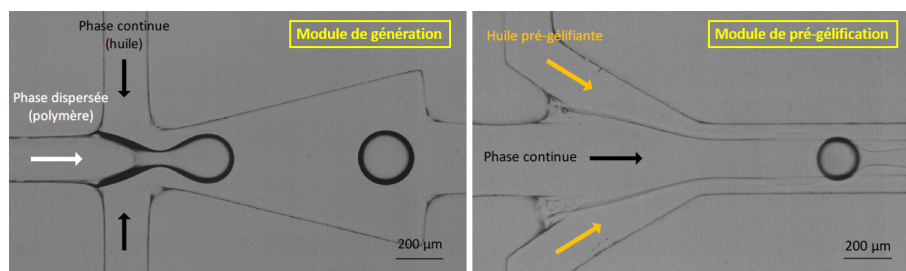


FIGURE 4.23 – Architecture microfluidique pour la production de microsphères d’alginate.

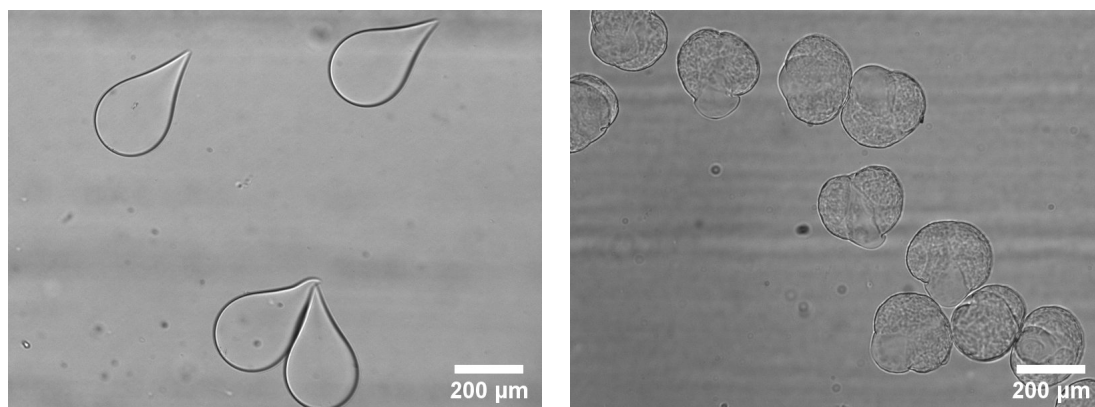
Cette huile est une huile végétale biologique souvent utilisée pour des applications d’encapsulation cellulaire. Lors du co-écoulement, les cristaux diffusent de l’huile pré-gélifiante vers les microsphères et gélifient partiellement les microgouttes d’hydrogels contenant de l’alginate. Cette pré-gélification permet aux microsphères d’être récupérées au sein d’une phase aqueuse en conservant la structure sphérique des microsphères. Le transfert des microsphères en phase aqueuse s’effectue par simple récupération des microsphères dans un contenant rempli d’un bain de gélification. Ce bain de gélification est une phase aqueuse contenant des ions calcium à une concentration de 30 mM permettant de compléter la gélification des microsphères. Les microsphères sont conservées 5 minutes dans ce bain, puis transférées dans une solution faiblement concentrée en ion calcium (2 mM) afin de maintenir la gélification des microsphères.

Ajustement des paramètres de production

Les paramètres de production doivent également être ajustés afin de produire les microsphères d’alginate - collagène. Le débit à imposer pour la phase d’huile pré-gélifiante ainsi que la concentration massique en ion calcium doivent être contrôlés précisément. En effet, un débit d’huile pré-gélifiante ou une concentration trop faible provoquera une non-gélification des microsphères. Lors de la sédimentation en phase aqueuse, les microsphères seront non-gélifiées et apparaîtront sous forme de larmes (Figure 4.24). A l’inverse, un débit d’huile pré-gélifiante ou une concentration trop importante entraînera une pré-gélification rapide des pôles des microgouttes proches des parois, entraînant une structure boursouflée des microsphères (Figure 4.24b). Néanmoins un bon paramétrage des pressions appliquées permet d’obtenir des microsphères lisses, comme on peut le voir pour des microsphères produites avec deux alginates différents (Figure 4.25).

Limites de la technique microfluidique

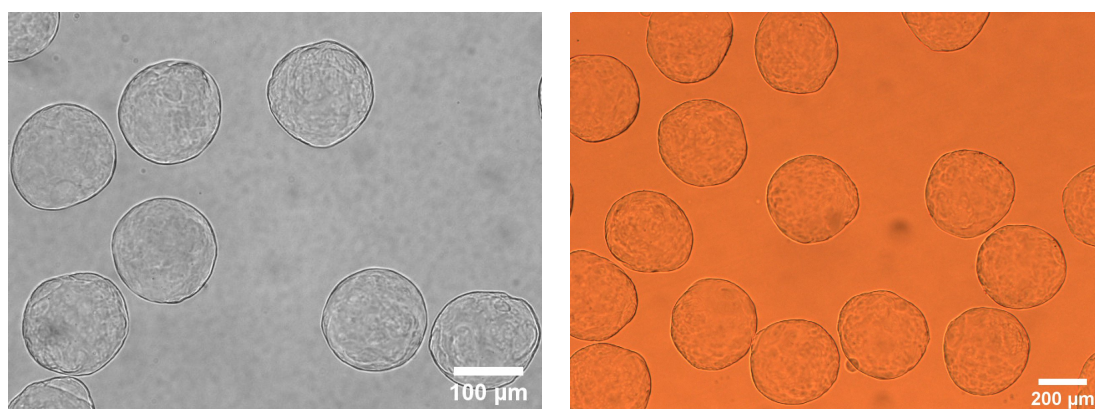
Un mélange de collagène à la concentration finale de 3 mg/mL et d’alginate à la concentration finale de 2% (SLM2-Col3) est utilisé pour la production de microsphères. L’utilisation de l’alginate facilite la production de microsphères. La sortie du tube microfluidique transportant les microgouttes en formation débouche dans une couche d’huile recouvrant un bain de calcium. Grâce à la densité du mélange de collagène et d’alginate plus importante que celle de l’huile, les microgouttes pré-gélifiées sédimentent facilement de la phase



(a) Pression du canal d'huile pré-gélifiante trop faible.

(b) Pression du canal d'huile pré-gélifiante trop importante.

FIGURE 4.24 – Effet d'un mauvais paramétrage de la pression appliquée sur la forme des microsphères.



(a) Microsphères d'alginate SLG à 2%

(b) Microsphères d'alginate SLM à 2%

FIGURE 4.25 – Microsphères d'alginate produites par la technique microfluidique en phase aqueuse.

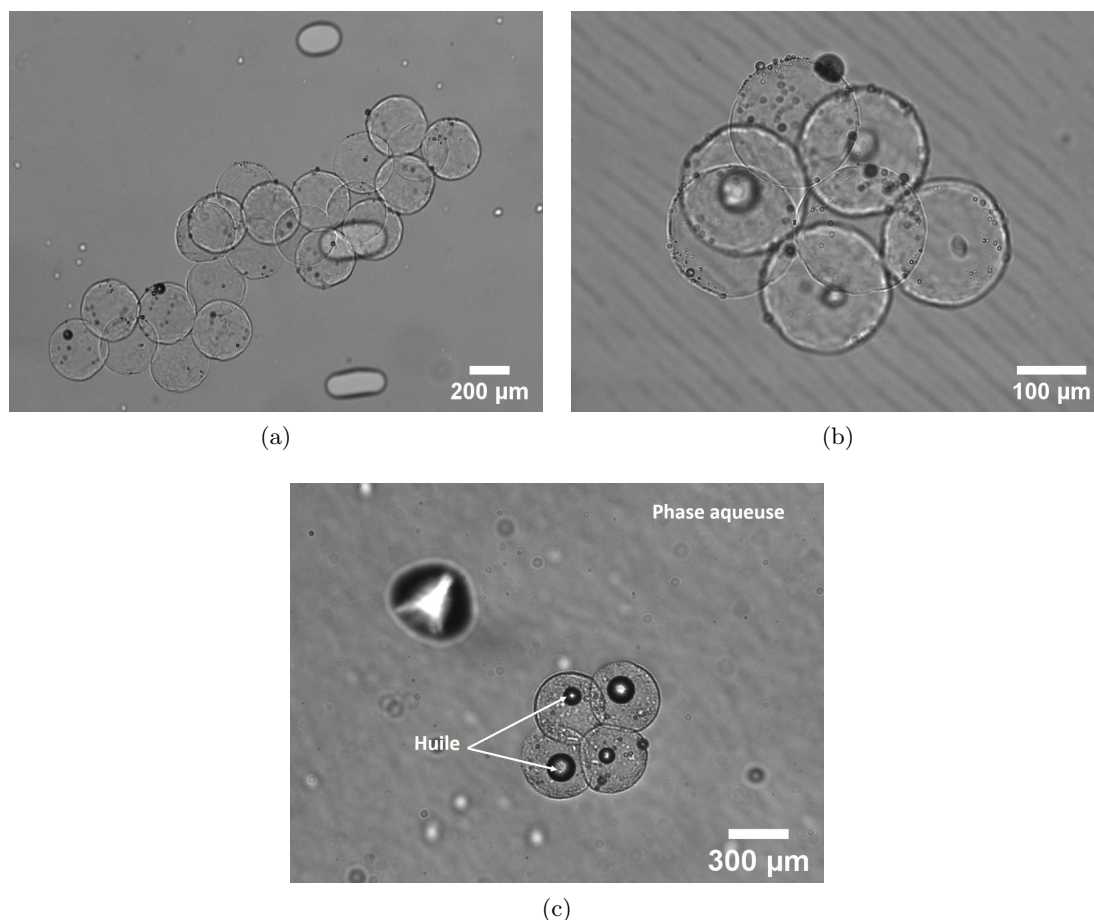


FIGURE 4.26 – Huile résiduelle à la surface des microsphères SLM2-Col3 dans du sérum physiologique.

d'huile vers la phase aqueuse. L'huile est ensuite retirée et les microsphères sont transférées dans du sérum physiologique. Cependant, des résidus d'huile sont accrochés à la surface des microsphères, comme on peut le voir Figure 4.26a, b & c, ce qui n'est pas le cas lors de la production de microsphères d'alginate seul.

L'accroche de ces gouttes d'huile coïncide avec la formation d'un précipité à l'interface entre la couche d'huile et le bain aqueux. Ce précipité devient de plus en plus important au cours de la production et empêche la sédimentation des microsphères vers la phase aqueuse. Une interface entre le bain aqueux et l'huile est montrée Figure 4.27a. Ce précipité se forme par simple mise en contact d'eau avec l'huile pré-gélifiante, mais il ne se forme pas lors de la mise en contact d'eau avec de l'huile de soja pure. Ainsi, ce précipité est dû aux cristaux d'acétate de calcium inclus dans l'huile de soja. Nous pensons que les cristaux de calcium absorbent les molécules d'eau de l'interface. De plus, les quelques microsphères en phase aqueuse ayant traversé l'interface restent proches de l'interface, comme on peut le voir Figure 4.27b, c & d.

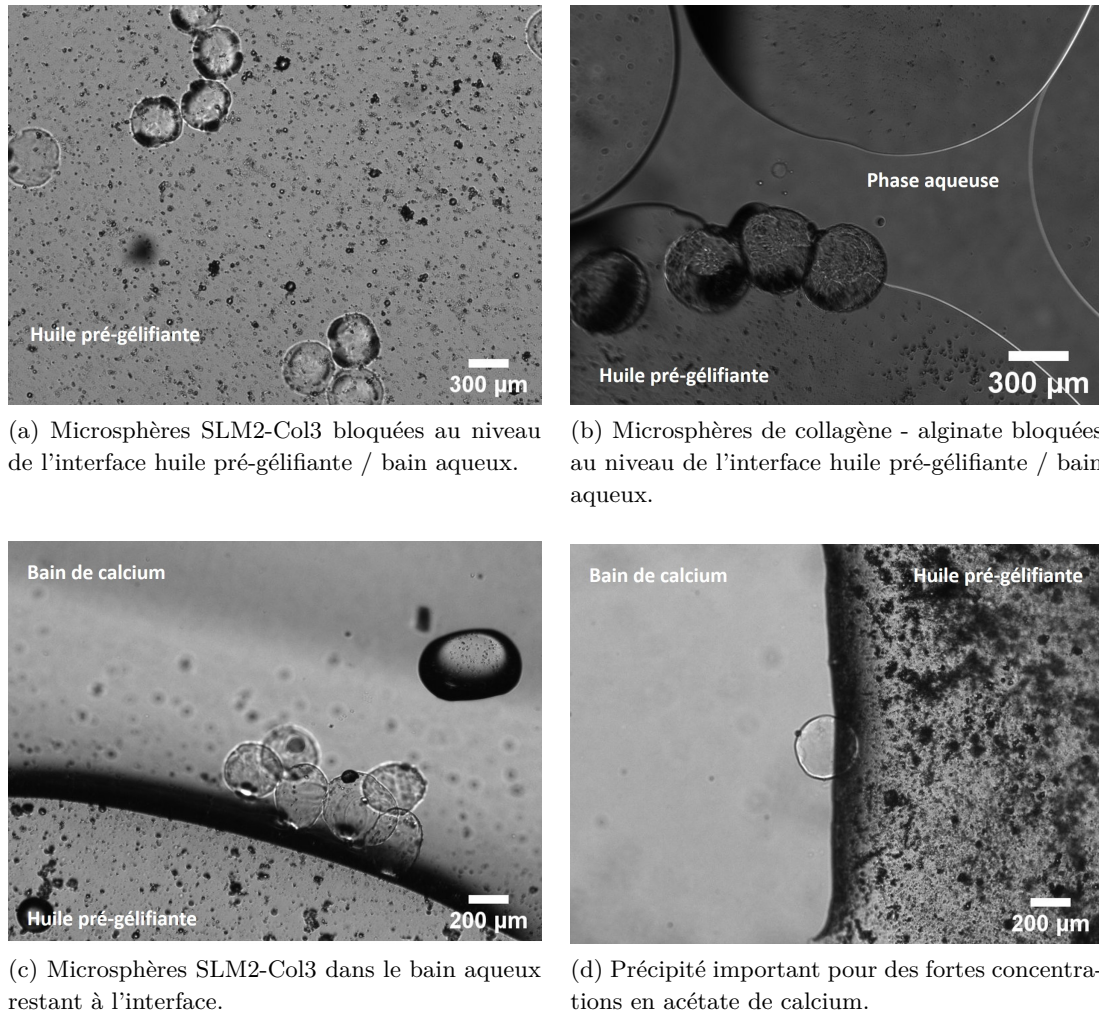
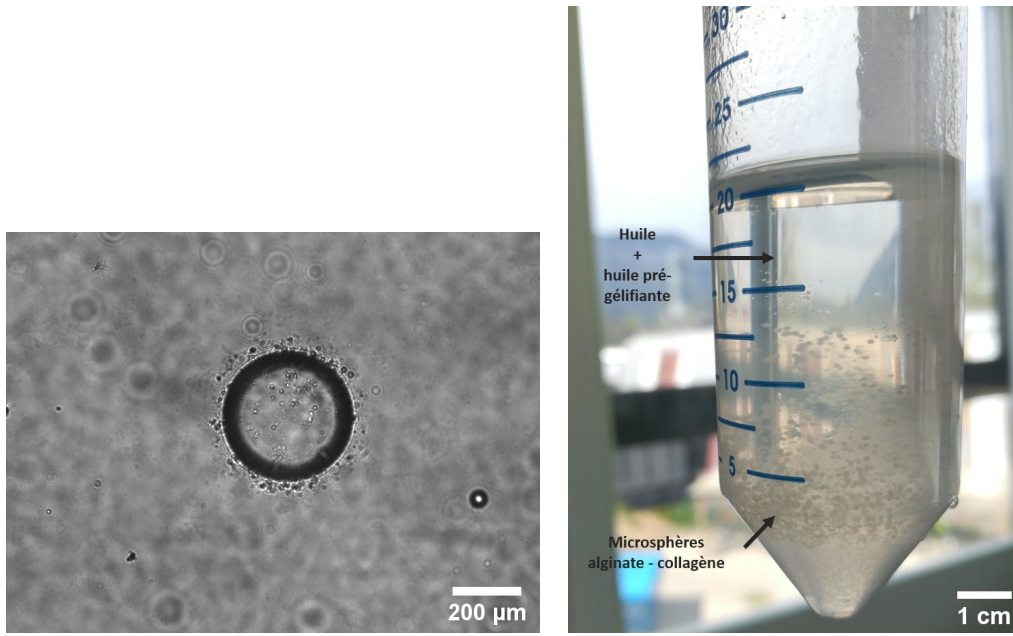


FIGURE 4.27 – Formation d'un précipité à l'interface entre le bain aqueux et l'huile contenant de l'acétate de calcium

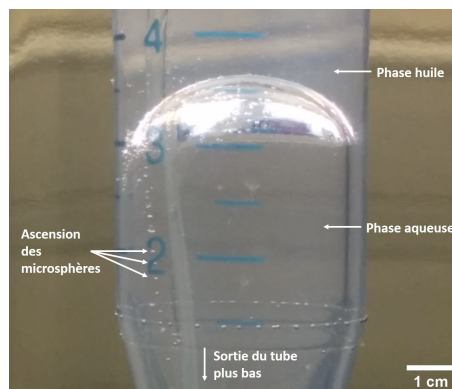
Comme la gélification du collagène cause le rejet de molécules d'eau, ce précipité apparaît également à l'interface des microsphères de collagène et d'alginate (Figure 4.28a). Ce précipité est parfois très important et s'observe à l'oeil nu dans le contenant de récupération par une apparence blanchâtre des microsphères (Figure 4.28b). Même lorsque le tube de sortie transportant les microsphères est placé directement dans le bain aqueux afin de favoriser la sédimentation de l'huile vers la phase aqueuse, les microsphères enveloppées d'une couche d'huile remontent vers la phase d'huile et restent bloquées à l'interface (Figure 4.28c).

Cette formation de précipité et la difficulté de sédimentation des microsphères compliquent la récupération des microsphères en phase aqueuse. De plus, l'huile résiduelle à la surface des microsphères n'est pas compatible avec une application de recouvrement de la surface par des cellules endothéliales. Ces difficultés ont été accompagnées d'un problème indépendant de notre volonté : la machine pratiquant la silanisation des cartes microfluidiques est tombée en panne. La silanisation des cartes permet de rendre la surface hydrophobe et empêche l'accroche de l'hydrogel au sein des canaux microfluidiques. Sans cette silanisation, de l'hydrogel non gélifié s'accroche dans les canaux et bloque la production des microgouttes (Figure 4.29). Face aux complications rencontrées, et à la panne de la machine effectuant la silanisation, une nouvelle technique de production de microsphères a été développée.



(a) Précipité se formant à la surface d'une micro-sphère SLM1-Col3 au sein d'un bain d'huile pré-gélifiante.

(b) Ascension des microsphères de la phase aqueuse vers la phase huile.



(c) Formation d'un précipité autour des microsphères dans la phase d'huile.

FIGURE 4.28 – Difficulté de transfert des microsphères de collagène-alginate au travers de l'interface huile / bain aqueux.

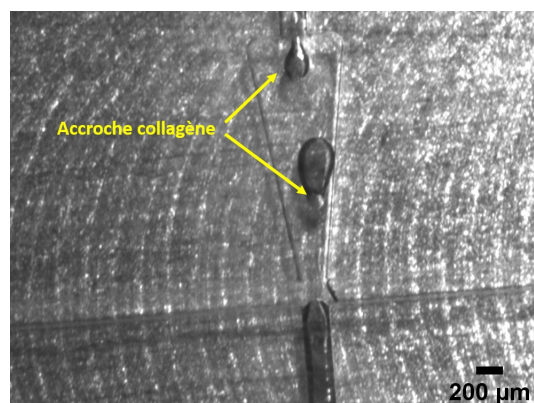


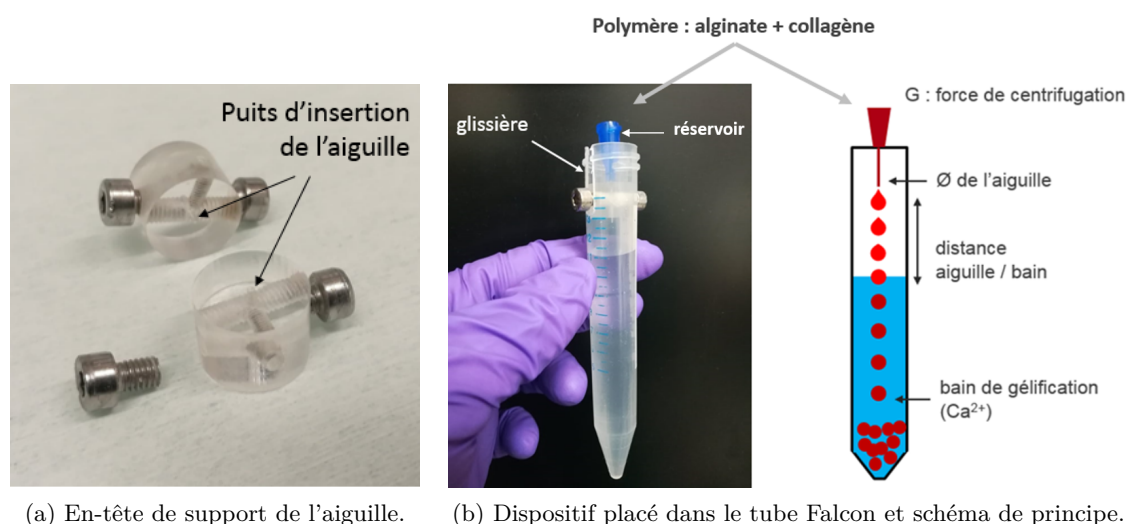
FIGURE 4.29 – Accroche de collagène au niveau du MFFD pour une carte non silanisée.

4.3 Production de microsphères de collagène par la technique Centricaps

4.3.1 Principe du dispositif

Un nouveau dispositif de production de microsphères d'hydrogel a été conçu. Ce dispositif s'inspire des dispositifs de dripping développés récemment utilisant la force centrifuge afin d'expulser l'hydrogel d'un orifice [340, 341, 342, 264]. L'hydrogel utilisé pour l'encapsulation est chargé dans un réservoir relié à une sortie capillaire. Le réservoir et l'aiguille sont intégrés au sein d'un tube rempli d'un bain de gélification. Une force centrifuge est appliquée au dispositif et permet l'expulsion de l'hydrogel au travers du capillaire et le détachement de gouttes de l'extrémité du capillaire. Cette méthode fait partie des techniques de dripping. Un des gros avantages de cette technique de production de microsphères, par rapport à celle microfluidique, est la non-utilisation d'huile. En effet, les complications, présentées précédemment, de formation de précipité et de non-sédimentation des microsphères SLM2-Col3 étaient causées par l'huile. Néanmoins, les dispositifs de dripping sont compatibles uniquement avec des hydrogels à la gélification rapide. Notamment, il est très difficile de former des microsphères de collagène pur avec un tel dispositif car les gouttes se dissolvent en phase aqueuse juste après leur production. Cependant cela ne constitue pas un problème dans notre cas, car l'utilisation de l'alginate permet d'augmenter la rigidité des microsphères produites, ce qui sera bénéfique pour le développement de notre structure d'empilement de microsphères.

Notre dispositif est constitué d'un simple cylindre dont le diamètre coïncide avec le diamètre interne d'un tube Falcon 15mL. Un puits d'insertion est intégré au sein de ce cylindre permettant le placement d'une aiguille. L'aiguille sert dans notre cas de réservoir de l'hydrogel et de capillaires d'extrusion de l'hydrogel (Figure 4.30a). Deux vis sont intégrées dans la face latérale du cylindre. Des glissières sont également usinées au sein d'un tube Falcon 15mL. Les vis permettent alors de placer et fixer le support de l'aiguille



(a) En-tête de support de l'aiguille. (b) Dispositif placé dans le tube Falcon et schéma de principe.

FIGURE 4.30 – Système Centricaps.

au sein du tube Falcon 15mL (Figure 4.30b). Nous appelons ce dispositif Centricaps. Le dispositif Centricaps est développé au sein d'un tube Falcon 15mL afin de pouvoir être utilisé avec une centrifugeuse de laboratoire.

En utilisation, le bain de gélification est chargé au sein du tube Falcon 15mL et l'en-tête de Centricaps est fixé dans la glissière du tube. L'hydrogel est ensuite chargé dans le réservoir de l'aiguille et l'aiguille est placée dans le puits d'insertion de l'en-tête. L'ensemble est alors placé dans la centrifugeuse et la centrifugation est activée. La force centrifuge force la pénétration du polymère dans l'aiguille et une microgoutte se forme à l'extrémité de l'aiguille. L'hydrogel s'accumule dans la microgoutte et se détache lorsque la tension interfaciale n'est plus suffisante pour retenir l'hydrogel. Lors de sa chute, la goutte d'hydrogel adopte une forme sphérique puis atteint le bain de gélification dans lequel elle se rigidifie.

4.3.2 Production de microsphères d'alginate - collagène

4.3.2.1 Production des microsphères

Plusieurs paramètres sont importants pour la production de microsphères avec cette technique :

- La force de centrifugation. Une force de centrifugation trop faible ne permet pas au polymère de traverser le capillaire. A l'inverse, une force de centrifugation trop importante place la production dans le régime de jet, présenté précédemment (Section 4.1.1.1). L'hydrogel est expulsé trop rapidement, ne permettant pas aux polymères de se détacher. Un cylindre d'hydrogel est alors obtenu (Figure 4.31a).
- La distance embout / bain de gélification. Lorsque l'hydrogel se détache, il adopte une forme sphérique lors de sa chute. Cependant, si la distance entre l'embout et

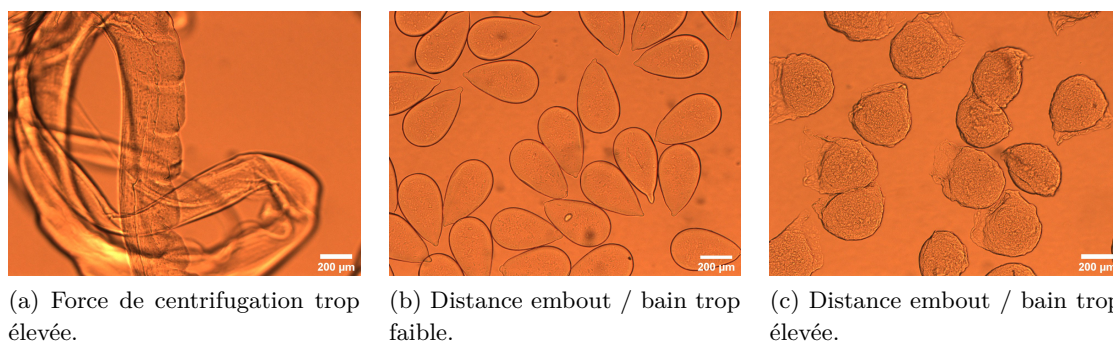


FIGURE 4.31 – Exemple de production de microsphères avec Centricaps pour des paramètres mal ajustés.

le bain de gélification n'est pas assez grande, l'hydrogel n'aura pas le temps de prendre sa forme sphérique et l'hydrogel gélifiera sous forme de larmes (Figure 4.31b). A l'inverse, lors de sa chute, la goutte accélère. Si la distance de chute est trop importante, la goutte entre en contact avec la phase aqueuse trop rapidement et le choc détériore la forme sphérique de la goutte (Figure 4.31c).

- Le diamètre de l'embout et la viscosité de l'hydrogel. Ces deux paramètres jouent sur le diamètre des microsphères formées. Le diamètre des microsphères diminue avec le diamètre de l'embout de l'aiguille. De même, le diamètre des microsphères diminue avec la viscosité.

Les paramètres optimaux doivent ainsi être ajustés pour chacun des hydrogels utilisés dont la viscosité varie. Le diamètre de l'aiguille doit être choisi selon le diamètre des microsphères que l'on souhaite produire. Pour un hydrogel et un diamètre d'aiguille donné, la force de centrifugation permettant de produire des microgouttes doit être trouvée, puis la dimension du bain de gélification doit être ajustée afin d'obtenir des microsphères à l'aspect lisse et dont la sphéricité est proche de 1.

Les paramètres de production avec Centricaps ont été ajustés pour plusieurs mélanges d'alginate et collagène afin de former des microsphères de diamètre proche de $300 \mu\text{m}$ (Figure 4.32).

L'homogénéité des microsphères peut être caractérisée par analyse d'image sur le logiciel de traitement d'image J. Les microsphères étant en fait des ellipsoïdes, le grand diamètre et le petit diamètre sont mesurés sur plus de 100 microsphères. Ces mesures permettent de calculer le coefficient de variation de tailles ainsi que la sphéricité des microsphères. Pour chaque paramètre et sur l'ensemble des expériences, le coefficient de variation de tailles est calculé inférieur à 5% et la sphéricité entre 92 et 95%. Ces valeurs caractérisent l'homogénéité des microsphères produites.

Ce dispositif permet en plus une fréquence de production améliorée. Pour un tube Centricaps centrifugé, entre 1000 et 2000 microsphères sont produites par centrifugation

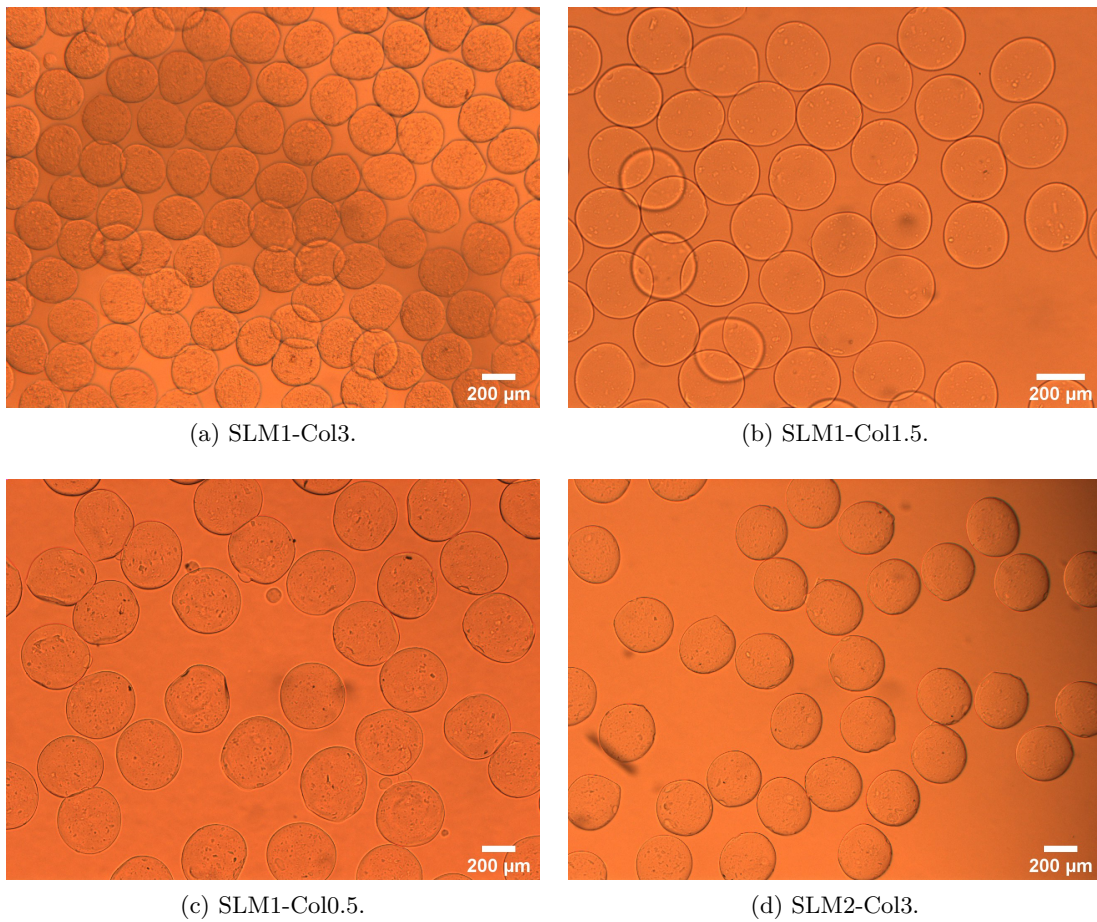


FIGURE 4.32 – Production de microsphères avec Centricaps pour différents mélanges d’alginate et collagène.

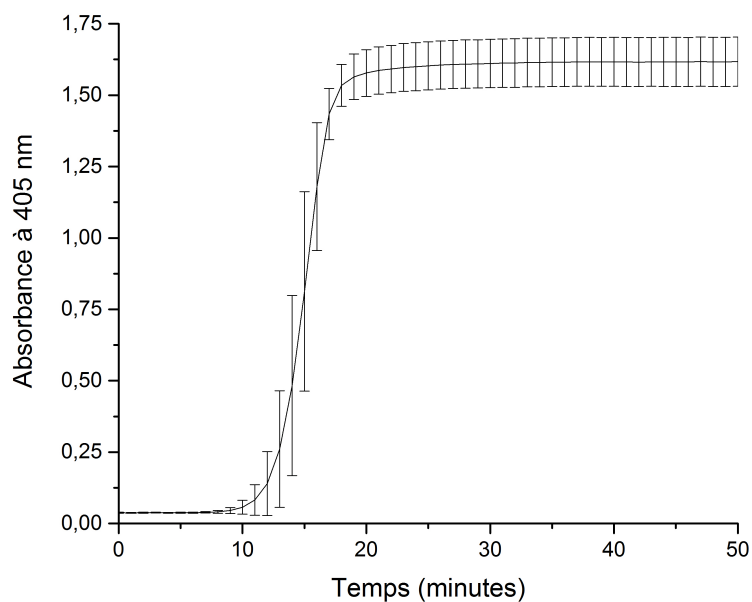
de 5 minutes. Plusieurs tubes Centricaps ont été fabriqués afin de permettre une production en parallèle au sein de la centrifugeuse. Cette rapidité de production constitue un avantage car, avec cette méthode, les microsphères sont produites et peuvent être chauffées moins de 10 minutes après la neutralisation du collagène. Ainsi, chaque microsphère a vu un temps de neutralisation du collagène identique avant chauffage à 37°C ce qui améliore l'homogénéité de la production.

4.3.2.2 Gélification des microsphères

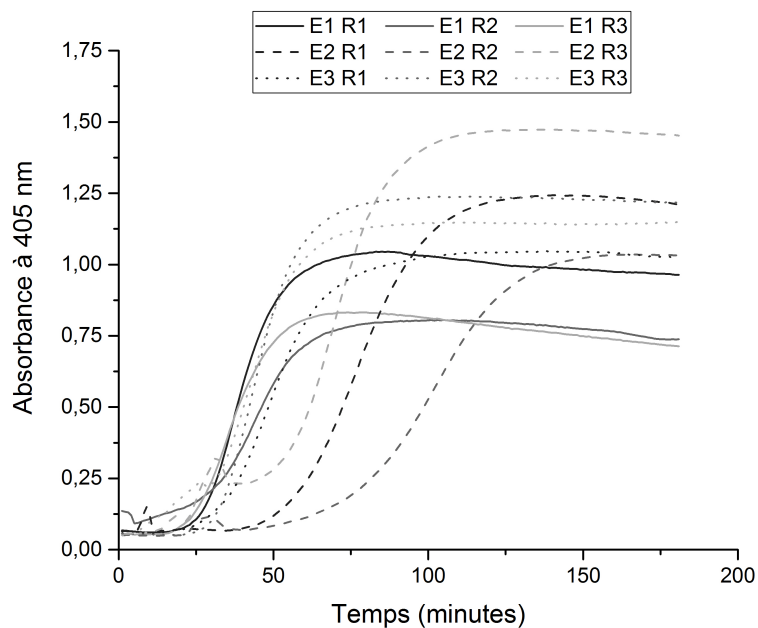
La production des microsphères d'alginate et collagène est réalisée dans un bain de calcium permettant la gélification de l'alginate contenu dans la microsphère. La gélification de l'alginate permet de conserver la structure sphérique et laisse le temps à la gélification du collagène dans un second temps. Les microsphères sont alors transférées dans du sérum physiologique et la solution est chauffée à 37°C afin de permettre la gélification du collagène.

Une mesure de la cinétique de gélification du collagène au sein d'un mélange d'alginate et de collagène est réalisée afin de déterminer le temps de chauffage nécessaire à la gélification du collagène dans ce mélange. Cette mesure a été effectuée sur un mélange SLM2-Col3 car ce mélange est celui qui a été le plus utilisé. La cinétique a été effectuée sur 3 échantillons préparés séparément, chaque échantillon ayant été divisé en 3 réplicats. Les courbes sont présentées Figure 4.33. Les courbes sont très variables entre chaque échantillon ainsi qu'entre chaque réplicat (Figure 4.33b). Chaque courbe atteint le plateau de gélification entre 60 minutes pour les plus rapides et 160 minutes pour les plus longues. La gélification du collagène à 37°C est au moins 3 fois plus longue que celle du collagène pur (Figure 4.33a). Il faut noter qu'au sein des microsphères, le collagène gélifie dans une structure d'alginate gélifiée, alors que pour ces mesures, l'alginate est liquide. En se basant sur ces courbes, les microsphères sont chauffées durant au moins 2 heures à 37°C afin d'induire la gélification du collagène. Les courbes indiquent également que notre mélange d'alginate et de collagène n'est pas homogène. Le mélange est effectué par pipetage délicat des deux solutions, mais la différence de viscosité entre la solution d'alginate et celle de collagène rend le mélange difficile. Bien que plusieurs cinétiques de gélification du collagène à partir d'un même mélange montrent des vitesses de gélification différentes, les microsphères produites à partir d'un même mélange présentent des aspects homogènes. Par exemple, la production de microsphères SLM2-Col3, avec les paramètres permettant de produire des microsphères de 300µm de diamètre, montre un coefficient de variation de taille inférieur de 4.7% ainsi qu'une sphéricité de 94.3%. Ces valeurs montrent l'homogénéité des microsphères produites.

Ces microsphères sont ensuite chauffées durant 2 heures à 37°C afin de gélifier le collagène.



(a) Collagène à 3 mg/mL (n=9).



(b) SLM2-Col3. Mesures effectuées sur 3 échantillons de 3 réplicats : ExRy = échantillon X du réplicat Y.

FIGURE 4.33 – Cinétique de gélification à 37°C du collagène à 3 mg/mL pur et au sein d'un mélange SLM2-Col3.

Conclusion

La production de microsphères de collagène sans utilisation de tensio-actifs est difficile. La technique microfluidique MFFD a été utilisée afin de former des microsphères de collagène, mais des effets de coalescence et des complications de la détection en phase aqueuse ont été observés. Des microsphères ont été produites en phase d'huile, mais le transfert en phase aqueuse provoque la détérioration des microsphères. Les structures de collagène sont trop fragiles et ne peuvent être utilisées afin de construire un empilement de microsphères. En revanche, l'association du collagène avec l'hydrogel alginate permet de bénéficier de la rigidité de l'alginate gélifié. Néanmoins, dans notre système microfluidique, le procédé de gélification utilisé génère la formation d'un précipité. Le précipité est causé par l'absorption d'eau par les cristaux d'acétate de calcium inclus dans l'huile de pré-gélification. Ce précipité empêche la sédimentation des microsphères et leur récupération en milieu aqueux.

Un second dispositif a été développé pour la production de microsphères d'alginate-collagène tirant parti de la gélification instantanée de l'alginate. Ce dispositif de dripping par force centrifuge permet de produire plus de 1000 microsphères par 5 minutes sans utilisation d'huile. Cette technique permet de concevoir des microsphères à la sphéricité proche de 1 directement en phase aqueuse. La gélification instantanée de l'alginate permet de conserver la structure des microsphères et de gélifier le collagène dans un second temps. Ainsi, des microsphères possédant du collagène, qui apporte des sites d'accroches aux cellules, et de l'alginate, qui apporte la rigidité nécessaire au développement de la structure d'empilement de sphères, sont conçues.

Des cellules endothéliales seront utilisées afin de recouvrir les microsphères et des empilements de sphères vont alors être formés afin de développer la structure poreuse endothélialisée.

Chapitre 5

Écoulement au sein d'un empilement de microsphères

Les microsphères recouvertes de cellules endothéliales sont destinées à être empilées dans une chambre microfluidique. Un milieu poreux composé d'un empilement de sphères est alors créé. Du milieu de culture est perfusé au sein de l'espace poreux formé par l'empilement, approvisionnant les cellules. La circulation du fluide au travers de l'empilement génère une force de cisaillement sur les parois recouvertes de cellules endothéliales. Cette force de cisaillement est proportionnelle à la vitesse du fluide et à la viscosité du liquide. Les cellules endothéliales sont sensibles aux forces de cisaillement et s'alignent dans le sens opposé de l'écoulement lorsqu'elles sont soumises à des cisaillements de l'ordre physiologique. Ainsi, en appliquant des forces de cisaillement contrôlées au sein de l'empilement, nous souhaitons induire l'orientation des cellules endothéliales et orienter la formation de capillaires sanguins dans les pores interstitiels du lit de sphères.

Afin de contrôler le cisaillement au sein de notre milieu formé par l'empilement de microsphères, il est nécessaire de comprendre la structure dans laquelle le fluide va circuler. Dans ce chapitre, nous étudions dans un premier temps la structure poreuse des empilements de sphères, puis nous analysons les cisaillements au sein de l'empilement et présentons une expression reliant le cisaillement au débit imposé. Enfin, nous caractérisons les écoulements en jeu dans notre milieu poreux et comparons les valeurs obtenues au modèle théorique.

5.1 La structure poreuse des empilements de sphères

L'écoulement d'un fluide au sein d'un canal microfluidique dépend, entre autres, de la nature du fluide, des pressions appliquées, et de la géométrie des canaux dans lequel il circule. Il est ainsi nécessaire d'étudier la géométrie des canaux afin de caractériser l'écoulement. Dans notre configuration, l'empilement des sphères forme un milieu poreux. Tous les espaces entre les sphères sont reliés entre eux et forment un réseau. Le but de ce chapitre est d'étudier cet empilement de sphères afin de déterminer la nature du réseau et

in fine d’estimer le cisaillement dans ce réseau pour un débit imposé.

Les lois de la mécanique des fluides caractérisant l’écoulement à l’intérieur de conduites rectangulaires ou cylindriques sont bien connues et permettent de caractériser l’écoulement de manière précise au sein de ces canaux. Au sein d’un empilement de sphères, la géométrie est complexe et les canaux dans lesquels le fluide peut circuler sont interconnectés et à section variable. Pour un empilement aléatoire, la géométrie est en plus irrégulière. Les empilements de sphères forment ainsi des milieux spécifiques. De par la complexité du problème, nous allons nous restreindre à deux configurations : les empilements compacts et les empilements aléatoires.

5.1.1 Porosité

Une des grandeurs essentielles caractérisant un milieu poreux est la porosité. La porosité ϵ est une grandeur adimensionnelle exprimant le pourcentage de vide de la structure définie par :

$$\epsilon = \frac{\text{Volume des vides}}{\text{Volume total}}$$

La porosité est liée directement à la compacité C :

$$C = \frac{\text{Volume des solides}}{\text{Volume total}}$$

de sorte que :

$$C + \epsilon = 1$$

La porosité d’un empilement de sphères monodisperses dépend de l’agencement des sphères les unes par rapport aux autres. On distingue ainsi deux types d’agencement : les empilements ordonnés et les empilements aléatoires.

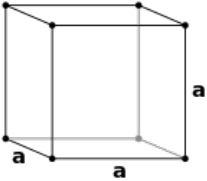
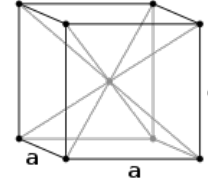
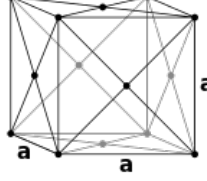
5.1.1.1 Empilements ordonnés

Les différentes façons d’empiler des sphères sont des sujets largement étudiés. Les empilements ordonnés forment des structures régulières et périodiques et sont utilisés pour modéliser les structures cristallines. Dans un empilement ordonné, les sphères sont arrangées selon un réseau de Bravais, c’est-à-dire une distribution régulière et répétée dans l’espace par translation suivant des vecteurs de bases. La structure des empilements réguliers étant une répétition de mailles, leur architecture est connue et fixée.

Ils existent 7 systèmes cristallins répartis en 14 réseaux de Bravais distincts. Les agencements les plus connus sont les agencements de type cubique. Les réseaux de Bravais associés sont le réseau cubique primitif (CP), le réseau cubique centré (CC) et le réseau cubique face centré (CFC). Ces réseaux sont représentés Tableau 5.1.

L’empilement cubique face centrée, également appelé hexagonal compact, est la structure la plus compacte obtenue pour un empilement de sphères. Dès 1611, Kepler a conjecturé que la technique d’empilement de sphères de taille égale la plus compacte était fournie

Tableau 5.1 – Réseaux de Bravais de type cubique

Nom du réseau	Cubique primitif	Cubique centré	Cubique faces centrées
Symbole de Pearson	cP	cI	cF
Maille élémentaire			
Compacité	52%	68%	74%
Porosité	48%	32%	26%

par la pyramide d’orange que l’on trouvait sur les étalages d’épiciers, correspondant à l’empilement cubique à faces centrées. Cette conjecture n’a été démontrée qu’en 1998, avec les travaux de Hale, et prouvée formellement en 2014 par ce dernier et son équipe [343]. Cependant, il est difficile en pratique de former des empilements ordonnés de dimensions macroscopiques.

5.1.1.2 Empilements aléatoires

De nombreuses études sur les empilements aléatoires de sphères ont été réalisées. Un empilement aléatoire est obtenu par empilement successif de sphères à l’intérieur d’un volume défini. Etant donné le caractère variable, il est difficile de décrire une valeur fixe de la porosité d’un empilement aléatoire de sphères indéformables mais il est établi que le milieu poreux créé possède une porosité variant dans une gamme de 36% jusqu’à 45% [344, 345, 346, 347]. Il n’est pas possible d’obtenir des structures de porosité inférieure à 36% en empilant aléatoirement des sphères indéformables. En déversant un tas d’orange dans un bac à fruit, la porosité obtenue ne peut être en dessous des 36% (arrangement aléatoire - Figure 5.1a) alors que le placement successif individuel des oranges les unes sur les autres selon un agencement cubique face centré formera une construction de porosité 26% (arrangement structuré CFC - Figure 5.1b).

La structure locale obtenue dans un empilement aléatoire est généralement un état intermédiaire entre l’empilement maximal cubique face centré ($\epsilon = 26\%$) et l’empilement lâche cubique simple ($\epsilon = 45\%$). Plus précisément, il a été évalué qu’en versant des billes en vrac dans un récipient, la porosité obtenue est comprise entre 40 et 42%. Cependant, il est possible de diminuer la porosité de l’empilement en secouant le récipient ou en compactant l’empilement jusqu’à atteindre la valeur minimale de 36%, mais il n’est pas possible d’aller en-deçà cette valeur.

Ce phénomène s’explique par la création de lacunes ou de dislocations maintenus en place par des voûtes qui sont le résultat d’équilibres collectifs entre plusieurs sphères [348].



(a) Empilement aléatoire - Porosité minimale de 36%.



(b) Empilement structuré selon un réseau cubique face centré - Porosité de 26%.

FIGURE 5.1 – Empilement d’oranges sur un étalage de marché.

Ces lacunes créent des formes irrégulières qui se propagent au fur et à mesure que l’on empile des sphères. Cependant, Guyon et Troadec précisent que, dans le cas de sphères lisses pouvant rouler et glisser facilement les unes sur les autres, ces voûtes sont instables [348]. Il est ainsi possible de rompre l’équilibre des voûtes en faisant vibrer l’empilement afin d’améliorer la compacité.

Un empilement aléatoire de sphères monodisperses et indéformables ne peut atteindre des porosités inférieures à 36%. Néanmoins, il est possible d’empiler deux populations de sphères de tailles différentes afin de diminuer cette valeur critique [349, 350]. L’appellation des différents types d’empilements aléatoires n’est pas définie. Les termes utilisés sont généralement empilement aléatoire compact pour une porosité de $\epsilon = 36\%$, empilement aléatoire dense pour des porosités de l’ordre de $\epsilon = 38 - 42\%$ et empilement aléatoire lâche pour des porosités supérieures.

5.1.2 Dimension locale des pores

Dans un empilement de sphères, la géométrie des pores est complexe et la section des pores dans laquelle le fluide peut circuler est variable. Les parois des pores étant amenées à être tapissées de cellules endothéliales, la dimension des pores déterminera la dimension des tubes endothéliaux développés. De plus, nous verrons par la suite que le cisaillement imposé est dépendant de la taille des pores. Il est ainsi nécessaire de contrôler cette dimension afin d’imposer un cisaillement de l’ordre physiologique à la surface des parois, afin d’induire un alignement des cellules endothéliales le long des lignes de courant. Nous allons comparer la taille caractéristique des pores pour un empilement compact et pour les empilements aléatoires.

5.1.2.1 Cas de l’empilement hexagonal compact

Au sein d’un empilement CFC compact de sphères, deux types de pores sont présents (Figure 5.2) : l’espace vide formé entre trois sphères en contact (Figure 5.2a) formant des

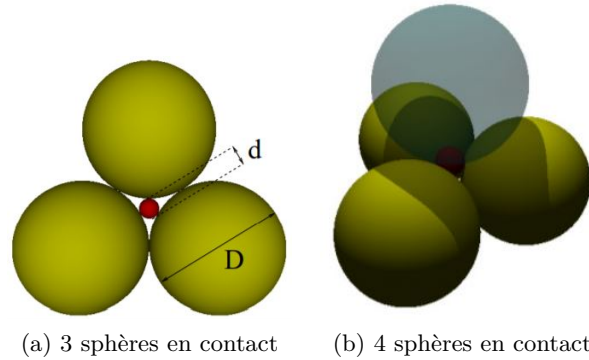


FIGURE 5.2 – Représentation de l'espace interbillés d'un réseau cubique face centrée dans lequel des billes, caractéristiques de la dimension des pores, peuvent circuler [352].

pores resserrés et celui formé par quatre sphères en contact (Figure 5.2b) formant des pores larges. Une dimension caractéristique de la taille de ces pores peut être donnée en considérant la sphère de plus grand diamètre pouvant être placée dans le pore [351]. Deux tailles caractéristiques de pores sont présentées. Les petits pores sont représentés par le diamètre d_1 de la plus grande sphère pouvant être placée au centre de l'espace formé par 3 sphères de diamètre D en contact (Figure 5.2a), soit :

$$d_1 = \left(\frac{2}{\sqrt{3}} - 1\right).D = 0.15D \quad (5.1)$$

A l'inverse, la dimension caractéristique d_2 des grands pores est obtenue en considérant la plus grande sphère pouvant être placée dans l'espace tétraédrique formé par 4 sphères (Figure 5.2b). Les calculs donnent :

$$d_2 = \left(\sqrt{\frac{3}{2}} - 1\right).D = 0.22D \quad (5.2)$$

La plus grande particule pouvant traverser le milieu formé par un empilement de CFC possède un diamètre de $0.15D$.

La dimension des pores dépend du diamètre des sphères empilées. Si l'on forme un empilement compact CFC, il est ainsi possible d'ajuster la taille des pores en jouant sur la taille des sphères. Pour un empilement hexagonal compact de microsphères de $300 \mu\text{m}$, les pores de l'empilement possèdent une géométrie et une section variable. Si l'on considère le plus grand cercle pouvant être inséré dans les sections, le diamètre des pores varie de $d_1 = 45 \mu\text{m}$ à $d_2 = 66 \mu\text{m}$.

5.1.2.2 Cas de l'empilement aléatoire

Pour un empilement ordonné, le réseau est régulier et symétrique, la géométrie des pores est ainsi répétée dans l'espace. Pour un empilement aléatoire, l'agencement des sphères est variable et complique la caractérisation de la taille des pores. Des analyses

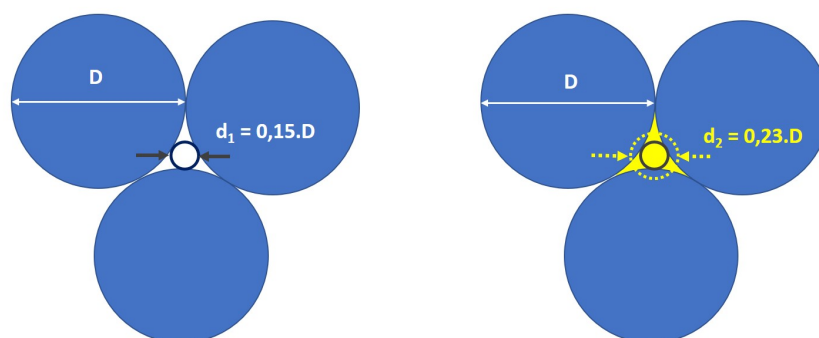


FIGURE 5.3 – Illustration de l’écart de taille mesuré selon la considération utilisée pour caractériser le diamètre des pores.

statistiques sont effectuées afin de déterminer la taille caractéristique des pores les plus fréquents, par mesure de la distribution des tailles de pores au sein de la structure. Pour des empilements aléatoires de sphères homogènes, les distributions de taille de pores sont généralement normalisées par le diamètre des sphères empilées.

Un agencement aléatoire des sphères crée des pores de géométrie variable. La taille des pores peut être caractérisée de différentes manières : en considérant le diamètre de la plus grande sphère pouvant s’insérer dans chaque pore, comme précédemment, ou en utilisant la notion de diamètre équivalent. Le diamètre équivalent d’un pore est le diamètre de la sphère qui possède les mêmes propriétés que le pore. Par exemple, en termes de volumes, le diamètre équivalent d’un pore correspond au diamètre de la sphère dont le volume est identique au volume du pore. On peut également raisonner en terme de section : au sein d’une section de pore, le diamètre équivalent du pore correspond au diamètre du disque dont l’aire est identique à l’aire du pore. Cette notion de diamètre équivalent est souvent utilisée afin de caractériser la dimension des pores et génère des différences de valeur de taille de pore : si, comme précédemment, on caractérise les pores par la plus grande sphère pouvant être placée au sein d’une section pore, cela fournit des dimensions plus petites que si l’on mesure la taille des pores par le diamètre équivalent surfacique, par exemple (Figure 5.3). Dans le cas d’un pore formé par l’espace entre 3 billes en contact de diamètre D , le diamètre de la plus grande sphère de diamètre d_1 pouvant être insérée mesure $0.15.D$ alors que le diamètre équivalent surfacique d_2 mesure $0.23.D$.

Néanmoins, la distribution de taille fournit des indications sur la variation des tailles rencontrées, valable quelque soit le modèle de calcul utilisé. Nous allons comparer les différents modèles d’empilement aléatoire lâche ($\epsilon = 0,44 - 0.48$), denses ($\epsilon = 0,38 - 0.42$) ou compact ($\epsilon = 0,36$). Nous utilisons les distributions de tailles afin de nous renseigner plutôt sur la variation des tailles de pores au sein d’un empilement aléatoire. Nous verrons Section 5.2.1.3 que la taille des pores peut être caractérisée par le diamètre hydraulique équivalent.

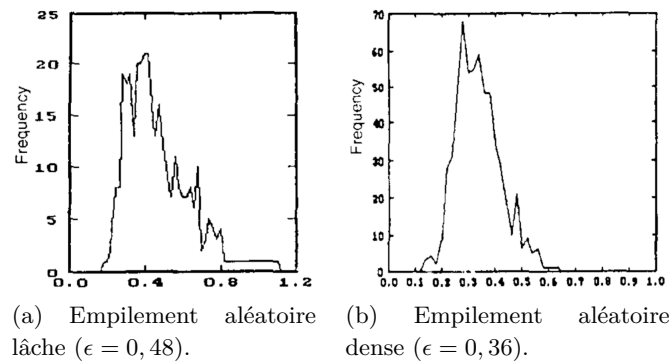


FIGURE 5.4 – Distribution de taille de pores d’un empilement aléatoire de sphères monodisperses normalisée par le diamètre des sphères empilées et obtenue par calculs numériques [353].

Nolan et Kavanagh étudient les distributions de tailles de pores au sein d’empilements aléatoires de sphères de différentes tailles, par des calculs numériques [353]. Parmi les nombreux cas étudiés, ils calculent la distribution de taille de pores au sein d’empilements de sphères monodisperses formant un empilement aléatoire lâche ($\epsilon = 0,48$) et un empilement aléatoire compact ($\epsilon = 0,36$). Pour un empilement lâche de sphères de diamètre D , le pore caractéristique le plus fréquent mesure $0,4D$, alors que pour un empilement compact il est inférieur à $0,3D$ (Figure 5.4). De plus, le profil de distribution est beaucoup plus étroit et la fréquence d’apparition du maximum de probabilité est plus importante dans le cas d’un empilement dense. La dimension locale des pores varie entre $0,2D$ et $0,5D$. Des résultats similaires sont trouvés par Yang *et al.* [354]. La dimension des pores les plus fréquents diminue lorsque l’empilement se compacifie. La courbe se resserre également indiquant une variabilité des tailles de pores plus faible : l’empilement aléatoire compact tend vers une structure régulière.

Roobahani *et al.* montrent l’influence de la méthode de calcul utilisée sur la PSD [355]. Ils comparent la différence dans la PSD calculée au sein d’un empilement aléatoire lâche de sphères ($\epsilon = 45\%$) par la méthode de triangulation de Delaunay et la méthode détaillée dans leur publication (Figure 5.5a) [356]. On observe une différence significative de taille caractéristique de pore ($0,4D$ pour la méthode de Delaunay contre $0,6D$ pour la méthode de Roobahani). De même, Dullien obtient une PSD au sein d’un empilement dense de sphères (Figure 5.5b) différente de celle proposée par Nolan (Figure 5.4b), avec un pic de distribution proche de $0,55D$, contre $0,3D$ pour celle de Nolan. Néanmoins la variation de la distribution est identique et montre des variations de diamètre de pores d’environ $\pm 0,15D$ autour de la valeur centrale.

Il est difficile d’établir des profils de pores au sein d’un empilement aléatoire de sphères monodisperses au vu de la diversité des modèles proposés. Néanmoins, il est possible d’établir certaines propriétés communes entre les modèles. Plus la densité de l’empilement

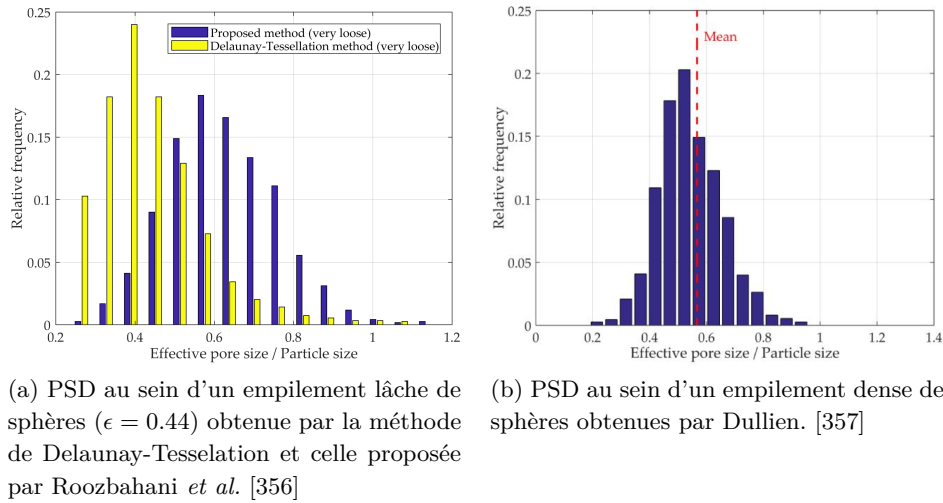


FIGURE 5.5 – Variations dans la loi distribution de tailles de pores selon la méthode de calcul.

augmente (la porosité diminue), plus la distribution de la taille des pores est resserrée autour de la valeur maximale de probabilité. Cela indique que la variation de taille des pores est moins prononcée. Cette propriété est également vérifiée pour les empilements ordonnés. L’empilement aléatoire compact possède des structures comprises entre l’empilement ordonné cubique simple et l’empilement cubique face centrée. Nous souhaitons par la suite former des empilements aléatoires compacts présentant des distributions de taille de pores peu variable. La distribution d’un empilement dense tend vers celle d’un empilement compact, avec des dimensions de taille de pores caractéristiques faibles, de l’ordre de $0.3 - 0.5D$ selon les études et des variations de dimensions de pores de l’ordre de $0.15.D$. Ces variations causeront des variations de vitesses d’écoulement qu’il nous faudra caractériser. Nous caractériserons également la taille des pores formés au sein de notre empilement à l’aide du diamètre hydraulique défini Section 5.2.1.3.

5.1.2.3 Effet de parois

Les études théoriques sur les empilements de sphères sont généralement menées sur des modèles d’empilement infinis. En pratique, les empilements de sphères sont formés dans des contenants de dimension finie dont les parois ont un effet sur la structure de l’empilement.

De nombreuses études analysent l’influence des parois sur des empilements de sphères au sein de contenants cylindriques. Les contenants cylindriques présentent l’avantage d’offrir des symétries radiales : au sein d’un plan transverse à l’axe du cylindrique, les variations de porosité sont considérées indépendantes de la direction. Dans ce cas, il a été observé des effets de parois lorsque le rapport entre le diamètre de la section du canal et le diamètre des sphères $D_{cylindre}/d_{sphères}$ était faible. Plus ce rapport est élevé, plus le nombre

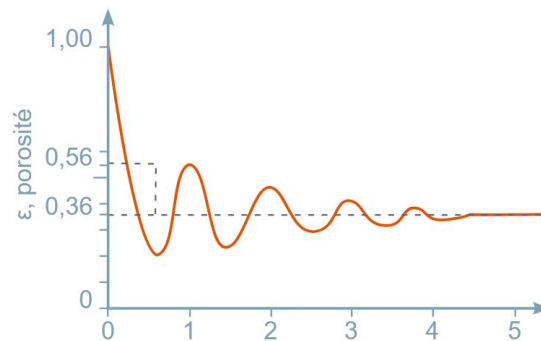


FIGURE 5.6 – Variation de porosité radiale en fonction du diamètre des sphères près d’une paroi plane. [358]

de sphères pouvant être placées dans une section du canal est important, et donc plus les effets des parois sont atténués. On peut en quelque sorte dire que l’empilement prédomine sur les parois. Pour des sphères de diamètre d empilées dans un contenant cylindrique de diamètre D , l’effet des parois est étudié en terme de distance à la paroi normalisée par rapport à d . Un profil radial de la porosité est montré Figure 5.6.

Les parois du contenant imposent une structure 2D sur les sphères en contact. Au niveau de la paroi, la structure 2D force les sphères à s’assembler de manière ordonnée. Comme les contacts entre les sphères 3D et la paroi 2D s’effectuent en un point, la porosité locale est maximale au niveau de la paroi et vaut 1. En revanche, les sphères s’alignent au niveau de la paroi, la concentration de sphères au niveau d’une distance $r = d/2$ est ainsi maximale, d’où la porosité minimale à cette distance. Ensuite, la porosité oscille jusqu’à obtenir une porosité moyenne proche de la porosité statistique globale d’un empilement infinie.

Plusieurs études ont analysé l’influence des parois d’un contenant cylindrique sur la porosité locale d’un empilement de sphères monodisperses, pour différents rapports $D_{cylindre}/d_{sphères}$. De Klerk résume différentes études sur la variation radiale de porosité (Figure 5.7) [359]. Pour ces études, les calculs prédictifs coïncident avec les mesures expérimentales [360, 361]. La majorité des études s’accorde sur l’allure oscillante de la porosité locale à partir des parois et sur l’affaiblissement des oscillations à partir de 4 - 5 diamètres de sphères pour atteindre la porosité globale de l’empilement [362].

L’effet des parois est généralement analysé au sein d’un contenant cylindrique. Dans notre application, les sphères seront empilées dans un canal à section rectangulaire de largeur 3 mm et de hauteur 2 mm. Les microsphères injectées ont des dimensions typiques de 300 μm . Ainsi, les sphères au centre de l’empilement sont situées au maximum à une distance de $1/0.3 = 3.33$ diamètres de sphères d’une paroi. L’effet de la paroi ne devrait donc pas être négligé. Cependant, des analyses complexes et coûteuses en temps doivent être menées afin d’étudier ce phénomène. Comme notre étude est réalisée en terme d’ordre de grandeur, nous décidons de ne pas tenir compte de l’effet des parois dans nos calculs

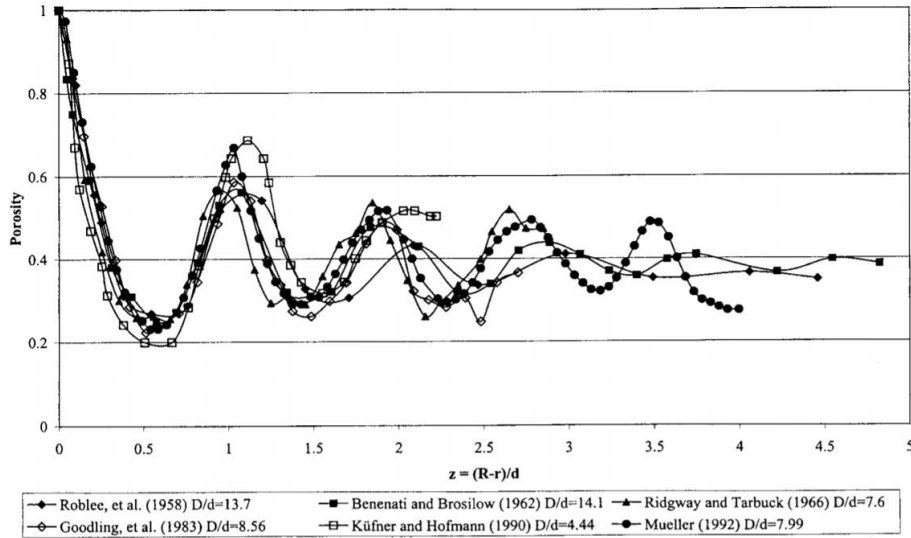


FIGURE 5.7 – Variation radiale de la porosité de différentes études. [359]

et de considérer un empilement infini de sphères monodisperses pour la suite de l’étude théorique.

5.2 Etude de l’écoulement au sein de l’empilement de sphères

Nous cherchons à caractériser l’écoulement au sein de l’empilement formé par nos microsphères de biopolymère, afin de contrôler le cisaillement imposé à la surface des microsphères. Nous venons de voir que la structure poreuse formée par un empilement de sphères monodisperses était variable et complexe. Comme le cisaillement et l’écoulement sont directement reliés à la géométrie des canaux dans lesquels le fluide circule, leur détermination est elle aussi complexe. Dans cette partie, nous présentons dans un premier temps un modèle permettant de déterminer le cisaillement moyen au sein de l’empilement, puis nous analyserons certaines publications afin d’observer les variations locales de cisaillement dans un empilement de sphères.

5.2.1 Etablissement du cisaillement moyen

La contrainte de cisaillement est une contrainte mécanique appliquée de manière tangentielle à la surface d’un matériau. Le passage d’un fluide en mouvement le long d’une surface génère une force de cisaillement sur la surface. Pour un écoulement de vitesse U circulant le long d’une paroi fixe dans la direction de x , l’expression du cisaillement est donnée par (Figure 5.8) :

$$\tau = \mu \cdot \frac{\delta U_x}{\delta z} \quad (5.3)$$

La contrainte de cisaillement correspond à la variation de la vitesse longitudinale dans la direction normale à la surface (direction transverse à la vitesse) multipliée par la viscosité

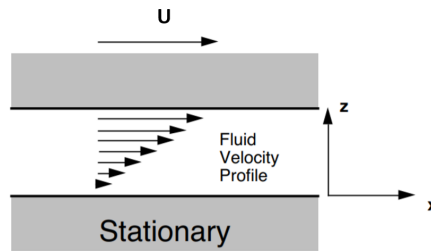


FIGURE 5.8 – Schéma explicatif du cisaillement.

Schéma tiré du cours en ligne : *Introduction to rock physics* de Gary Mavko du Standord Rock Physics Laboratory

dynamique du fluide. Elle est plus importante pour des fluides visqueux et des vitesses élevées.

Afin d'imposer le cisaillement du fluide à l'intérieur du milieu poreux, il est nécessaire de comprendre l'écoulement au sein d'un tel environnement. La circulation d'un fluide répond aux lois de Navier-Stokes et de conservation de la matière. Ces lois sont bien connues et sont largement utilisées dans le domaine de la mécanique des fluides. Pour un fluide incompressible et indilatable, l'équation de conservation de la matière prend la forme simple : $\nabla \cdot \vec{u} = 0$, avec \vec{u} la vitesse en tout point du fluide. L'équation de Navier-Stokes résulte de la loi de Newton appliquée à une unité de volume en tout point du fluide :

$$\frac{\partial \vec{u}}{\partial t} + \vec{u} \cdot \nabla \vec{u} = \vec{F}_e - \frac{1}{\rho} \cdot \nabla P + \nu \cdot \nabla^2 \vec{u}$$

où ρ et ν sont respectivement la masse volumique et la viscosité cinématique du fluide ; F_e est la résultante des forces extérieures et P la pression hydrostatique.

Ces équations sont résolues pour des écoulements au sein de canaux à section circulaire ou rectangulaire. Cependant, la complexité du domaine créé par un empilement de sphères ne permet pas de résoudre ces équations dans un tel milieu : elles ne présentent pas de solutions analytiques. Plusieurs études ont apporté des solutions de manière semi-empirique afin de prédire les écoulements dans ces milieux. L'analyse de l'écoulement au sein d'empilements de sphères est généralement menée au travers des modèles numériques et des mesures expérimentales sont généralement nécessaires afin de conforter ces modèles.

Dans cette section, nous définissons les paramètres de notre construction microfluidique, puis nous présentons un modèle théorique permettant de mesurer le cisaillement moyen au sein de notre empilement de sphères.

5.2.1.1 Définitions des paramètres

Dans notre cas, les microsphères sont empilées dans un canal à section rectangulaire. Notre situation est schématisée Figure 5.9 et la notation des différents paramètres est

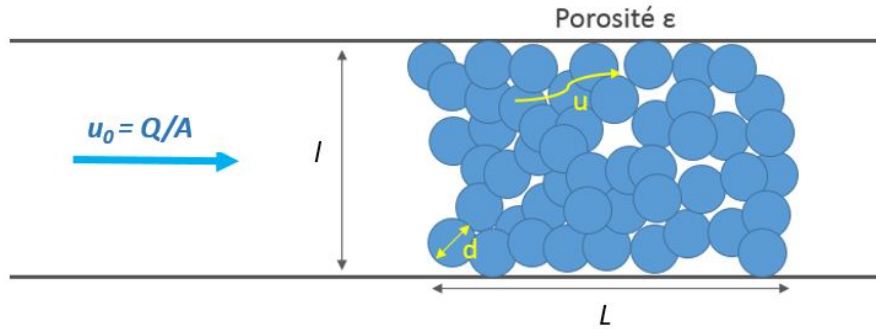


FIGURE 5.9 – Schéma de l'empilement de sphères et paramètres associés.

présentée Tableau 5.2.

Des sphères uniformes de diamètre d sont empilées dans un canal microfluidique de section $A = l * h$. Cet empilement crée une porosité ϵ . Le fluide circule dans le canal en amont à une vitesse moyenne u_0 et pénètre dans l'empilement de sphères. L'espace accessible au flux est réduit au sein de l'empilement, ce qui engendre une accélération de la vitesse interstitielle moyenne u au sein de l'empilement : $u > u_0$.

5.2.1.2 Les paramètres caractéristiques de l'empilement de sphères

Plusieurs paramètres macroscopiques caractéristiques de l'empilement sont présentés.

La porosité

Bien que la résistance de l'écoulement au travers d'un empilement soit liée à la quantité de particules présentes, il est plus simple de raisonner en terme de porosité globale de l'empilement. Un paramètre essentiel caractérisant les empilements de sphères est la porosité ϵ ou la compacité C . Nous rappelons leur définition :

$$\epsilon = \frac{\text{Volume des vides}}{\text{Volume total}} \quad (5.4)$$

$$C = \frac{\text{Volume des solides}}{\text{Volume total}} \quad (5.5)$$

$$C + \epsilon = 1 \quad (5.6)$$

Comme nous avons vu précédemment, un milieu formé par un empilement aléatoire de sphères possède une porosité maximale de 36% alors qu'un milieu formé par un agencement de sphères de type cubique face centrée possède une porosité de 26%. Un agencement de type cubique simple possède une porosité de 52% ($= \frac{\pi}{6}$) (Figure 5.10).

La porosité est indépendante de la taille des particules, et dépend essentiellement de leur agencement (voir Figure 5.10). Il faut bien faire la distinction entre porosité et taille de pores. La porosité est une grandeur globale caractéristique du vide total dans l'échantillon

Tableau 5.2 – Paramètres microfluidiques

Paramètres	Notation	Unité
Débit	Q	$[\mu\text{L/s}] = [\text{mm}^3/\text{s}]$
Vitesse en amont de l'empilement	u_0	$[\text{mm/s}]$
Vitesse interstitielle dans l'empilement	u	$[\text{mm/s}]$
Largeur de la section	l	$[\text{mm}]$
Hauteur de la section	h	$[\text{mm}]$
Section du canal microfluidique	$A = l * h$	$[\text{mm}^2]$
Longueur de l'empilement	L	$[\text{mm}]$
Porosité	ϵ	
Perte de charge	ΔP	$[\text{Pa}]$
Diamètre des sphères	d	$[\text{mm}]$
Diamètre hydraulique	D_h	$[\text{mm}]$
Surface spécifique	S_{sp}	$[\text{mm}^{-1}]$
Tortuosité	T	
Viscosité dynamique du fluide	μ	$[\text{Po}] = [\text{dyn.s/cm}^2]$
Contrainte de cisaillement	τ	$[\text{dyn/cm}^2]$

alors que la taille des pores est une longueur caractéristique de l’espacement entre les sphères. La porosité dépend essentiellement de l’agencement des particules, tandis que la taille des pores formés par l’empilement dépend de l’agencement des particules et de leur taille.

La surface spécifique

La surface spécifique S_{sp} est définie comme le taux de surface par unité de volume. Elle est ainsi exprimée en $[m^2]/[m^3] = [m^{-1}]$. Ce paramètre représente la quantité de surface d’un élément par rapport au volume total. D’un point de vue fluïdique, on peut se représenter la surface spécifique comme la quantité de surface en contact avec le fluïde lors de l’écoulement.

Par exemple, pour un canal cylindrique de diamètre D et de longueur L , la surface spécifique vaut :

$$S_{sp}(canal) = \frac{Surface\ canal}{Volume\ canal} = \frac{\pi \cdot D \cdot L}{\pi \left(\frac{D}{2}\right)^2 \cdot L} = \frac{4}{D}$$

La surface spécifique d’une sphère isolée de diamètre d est de :

$$S_{sp}(sphère) = \frac{Surface\ sphère}{Volume\ sphère} = \frac{4\pi \left(\frac{d}{2}\right)^2}{\frac{4}{3}\pi \left(\frac{d}{2}\right)^3} = \frac{6}{d} \quad (5.7)$$

Au sein d’un empilement de sphères de diamètre d , la surface spécifique du milieu poreux est définie par la surface spécifique d’une sphère fois le taux de solide de l’empilement C . Ainsi :

$$S_{sp} = (1 - \epsilon) \cdot S_{sp}(sphère) = \frac{6}{d}(1 - \epsilon) \quad (5.8)$$

La surface spécifique est inversement proportionnelle au diamètre des sphères. En effet, la surface spécifique représente une quantité de surface par unité de volume. Ainsi, pour une porosité fixée, plus le diamètre des sphères est faible, plus le nombre de sphères composant l’empilement est important. Ainsi, la quantité de surface solide augmente.

Illustrons nos propos par un exemple simple représenté Figure 5.10 : dans un cube virtuel d’arête a , il est possible de placer une sphère de rayon $a/2$ (cas 1) ou huit sphères de rayon $a/4$ (cas 2). Dans les deux cas, la porosité (et donc la compacité) est identique et vaut 52% (et 48% respectivement). Cependant, pour une même porosité au sein d’un volume défini, le nombre de particules a augmenté dans le cas 2, donc le taux de surface des sphères a augmenté : il est deux fois plus importants dans le cas 2 que dans le cas 1.

Comme la surface spécifique représente une quantité de parois en contact avec le fluïde, plus elle est grande, plus la résistance du milieu causée par les frottements entre le fluïde et les parois sera importante.

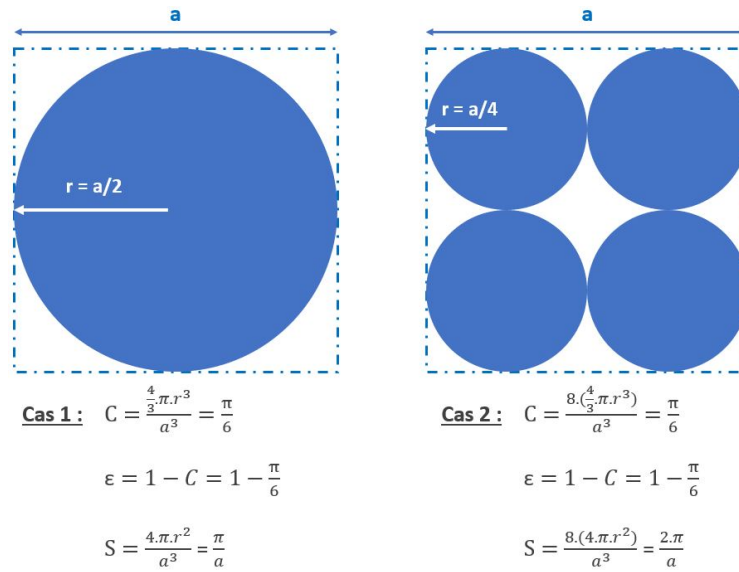


FIGURE 5.10 – Comparaison des paramètres dans le cas d'une sphère contenue dans un cube (cas 1) et de huit sphères deux fois plus petites contenues dans ce même cube (cas 2).

Tortuosité

Un paramètre important d'un empilement de sphères est la tortuosité T . La tortuosité est un paramètre traduisant l'extension de distance parcourue par le fluide traversant un empilement d'épaisseur total L (Figure 5.11). Elle est définie par :

$$T = \frac{L'}{L} \quad (5.9)$$

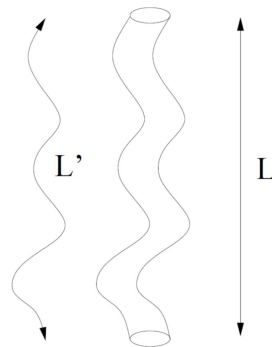


FIGURE 5.11 – Schéma illustrant la définition de la turtuosité : $T = L'/L$ [352].

Ce paramètre est difficilement déterminable expérimentalement. A notre connaissance, il n'existe actuellement pas de méthodes permettant de mesurer directement la tortuosité. Plusieurs relations obtenues empiriquement ont été proposées afin d'exprimer la tortuosité

en fonction de la porosité. Abbas liste les différentes relations proposées [363] :

$$T = 1.5 - 0.5\epsilon \quad (\text{Maxwell, 1873})$$

$$T = 1 - 0.5 \ln(\epsilon) \quad (\text{Weissberg, 1963})$$

$$T = 1 - 0.41 \ln(\epsilon) \quad (\text{Comiti et Renaud, 1989})$$

$$T = \sqrt{1 - \ln(\epsilon^2)} \quad (\text{Boudreau, 1996})$$

Cependant, la relation la plus utilisée dans les études est celle d'Archie :

$$T = \frac{1}{\epsilon^n} \quad (\text{Archie, 1942})$$

où n est une valeur numérique dépendant des propriétés de l'empilement [364]. La plupart des valeurs utilisées dans les différentes études varient entre 1 et 1.65 [365]. Pour notre étude théorique, comme nous ne pouvons mesurer précisément cette valeur, nous effectuerons les calculs pour ces deux valeurs extrêmes de tortuosité.

5.2.1.3 Caractérisation de l'écoulement

Afin de caractériser l'écoulement du fluide au sein de notre empilement poreux, nous utilisons le modèle de Carman et le modèle d'Ergun largement décrits dans la littérature [366] et valables pour des écoulements laminaires au sein d'empilement de sphères. Les pores d'un empilement sont complexes et forment des tubes interconnectés à section variable. Ces modèles considèrent que l'espace poreux de l'empilement est équivalent à plusieurs tubes cylindriques droits de section constante de sorte que la porosité et la surface spécifique soient inchangées (Figure 5.12). Le diamètre des tubes cylindriques équivalent est appelé diamètre hydraulique.

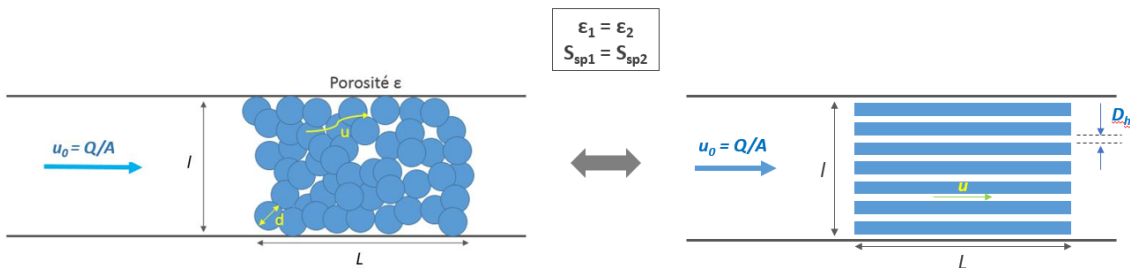


FIGURE 5.12 – Représentation de l'empilement de sphères par un modèle de tubes cylindriques droits équivalents.

La diamètre hydraulique

Le diamètre hydraulique D_h est une grandeur fictive attribuée à un canal afin de le considérer comme un tube à section circulaire de diamètre D_h . De cette manière, il est possible d'effectuer les calculs de mécanique des fluides classiques au sein de géométrie complexe en utilisant une géométrie cylindrique équivalente. Dans sa définition globale, le

diamètre hydraulique est le diamètre de canaux cylindriques pour lequel un milieu poreux de longueur L peut être modélisé par un ensemble de ces canaux de même longueur et dont la surface spécifique est conservée. Il est défini par 4 fois le volume accessible au fluide divisé par la surface mouillée [367]. Ainsi, pour un canal cylindrique de longueur L et rayon D , on retrouve bien :

$$D_h = 4 \cdot \frac{\frac{\pi D^2}{4} L}{\pi D L} = D \quad (5.10)$$

Dans le cas d'un empilement de sphères, la géométrie des tubes étant à section variable, on parle de diamètre hydraulique moyen. En considérant qu'il n'existe pas de pores fermés (tous les pores sont accessibles au fluide), il peut être exprimé en fonction de la porosité et du diamètre des sphères :

$$D_h = 4 \cdot \frac{Vol. \text{ accessible}}{Surf. \text{ mouillée}} = 4 \cdot \frac{\epsilon \cdot V_{total}}{S_{sp} \cdot V_{total}} = 4 \cdot \frac{\epsilon}{S_{sp}} \quad (5.11)$$

En remplaçant l'équation 5.8 dans 5.11, on obtient le diamètre hydraulique moyen d'un empilement de sphères monodisperses :

$$D_h = \frac{2}{3} \cdot \frac{\epsilon}{(1 - \epsilon)} \cdot d \quad (5.12)$$

Pour un empilement de sphères de 300 μm formant un empilement aléatoire compact ($\epsilon = 0.36$), le diamètre hydraulique vaut 112.5 μm et pour un empilement compact CFC, il est de 70 μm . Pour un empilement de sphères de 200 μm formant un empilement aléatoire compact, il est de 75 μm (contre 46 μm dans le cas du CFC). Il est ainsi possible de moduler le diamètre de l'espace inter-sphères afin de faire correspondre le diamètre hydraulique des pores à celui des capillaires sanguins : en formant un empilement aléatoire compact, le diamètres des microsphères doit être de 80 μm afin de former un réseau de pores de diamètre hydraulique moyen 30 μm . Néanmoins nous négligeons dans notre modèle la croissance des cellules à la surface des microsphères qui réduit la dimension des pores.

La vitesse interstitielle moyenne

L'écoulement de vitesse u_0 en amont de l'empilement pénètre le milieu poreux. Le rétrécissement engendré par le milieu poreux provoque une accélération du fluide au sein de l'empilement. Comme la porosité est un paramètre isotropique, des considérations de continuité de l'écoulement permettent d'établir la relation entre la vitesse moyenne en amont de l'empilement, la porosité, la tortuosité et la vitesse moyenne interstitielle au sein de l'empilement :

$$u = \frac{u_0 \cdot T}{\epsilon} \quad (5.13)$$

Nombre de Reynolds

Le modèle de Carman est valable pour des écoulements laminaires. Le calcul du nombre de Reynolds permet de définir le régime d'écoulement.

Le nombre de Reynolds joue un rôle important en mécanique des fluides. Ce nombre caractérise le rapport des forces d’inertie sur les forces visqueuses. Ce rapport détermine le type de régime de l’écoulement. Lorsque les forces visqueuses prédominent, le régime est laminaire et les lignes de courant sont parallèles aux canaux dans lequel le fluide circule. Dans les systèmes microfluidiques, il est généralement le régime rencontré. Lorsque les forces d’inertie prédominent, le régime est dit turbulent et les lignes de courant ne suivent plus les géométries des canaux. Lorsque les forces visqueuses et les forces d’inertie sont équivalentes, le régime est dit transitoire (Figure 5.13).

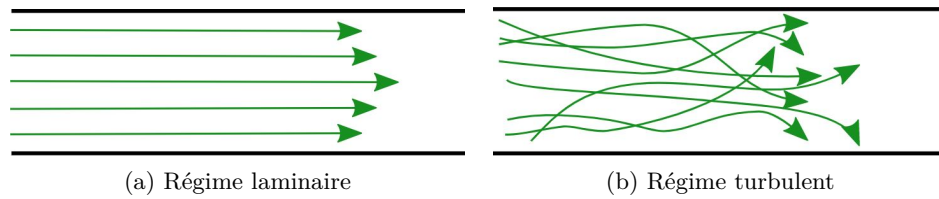


FIGURE 5.13 – Lignes de courant au sein d’un canal selon les régimes d’écoulement.

Le nombre de Reynolds permet ainsi de caractériser le régime de l’écoulement. C’est une donnée importante à caractériser en premier lieu lors de l’étude d’un écoulement, car elle détermine le type d’écoulement rencontré. Ce nombre est obtenu en adimensionnant les équations de Navier-Stokes. Il est défini par :

$$Re = \frac{V.L}{\nu}$$

avec V la vitesse caractéristique du fluide, L la dimension caractéristique du canal, et ν la viscosité cinématique du fluide. ν vérifiant :

$$\nu = \frac{\mu}{\rho}$$

avec ρ la masse volumique du fluide et μ la viscosité dynamique du fluide.

Au sein de l’empilement de sphères, le nombre de Reynolds s’écrit :

$$Re = \frac{u.D_h}{\nu} = \frac{1}{\nu} \cdot \left(\frac{u_0.T}{\epsilon} \right) \cdot \left(\frac{1}{6} \cdot \frac{\epsilon}{(1-\epsilon)} \cdot d \right)$$

Soit :

$$Re = \frac{1}{6.\nu} \cdot \frac{u_0.d.T}{(1-\epsilon)} \quad (5.14)$$

Scheiddeger introduit une valeur critique de Re_c pour laquelle les forces visqueuses prédominent et les forces d’inertie peuvent être négligées [367]. En deçà de cette valeur critique, le nombre de Reynolds indique un écoulement de type laminaire linéaire. La valeur de Re_c est discutée dans la littérature. Pour Scheiddeger, $0.1 < Re_c < 75$, alors que pour Childs et Collis-George, $Re_c = 1$ [368]. Dullien a proposé d’exprimer ce nombre en

fonction de la porosité du milieu par : $Re_c = a.(1 - \epsilon)$ avec a une constante comprise entre 1 et 10 [357].

Dybbbs et Edwards expliquent que le passage d'un écoulement linéaire à un écoulement turbulent s'effectue par des régimes intermédiaires dépendant du nombre de Reynolds (Figure 5.14). Pour un nombre de Reynolds compris entre 1 – 10 et 150, les forces d'inertie ne sont plus négligeables devant les forces visqueuses : le régime est dit laminaire non linéaire. Pour un nombre de Reynolds compris entre 150 et 300, le régime est dit laminaire instable. Pour un nombre de Reynolds supérieur, le régime est non stationnaire.

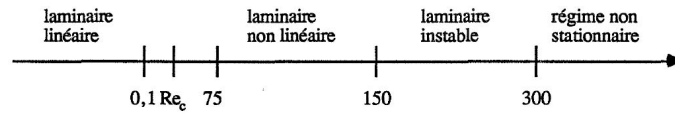


FIGURE 5.14 – Domaine d'existence des différents régimes d'écoulement au travers d'un milieu poreux. [366]

Pour notre application, nous verrons que nous devons nous restreindre majoritairement à des sphères de diamètre oscillant entre 300 et 350 μm . Le débit imposé est proche de 1 – 1.5 mL/min dans une section de canal de $3 * 2 \text{ mm}^2$. Du milieu de culture pouvant s'apparenter à de l'eau est injecté. La valeur de la viscosité cinématique à 37°C est utilisée. En considérant un empilement aléatoire compact ($\epsilon = 0.36$), on obtient une valeur caractéristique pour le nombre de Reynolds au maximum de : $0.47 < 1$. Nous considérons donc que le régime au sein de notre empilement est laminaire linéaire et que le modèle de Carman peut être utilisé.

5.2.1.4 Le cisaillement global

Pour un canal cylindrique de diamètre D perfusé par un fluide de vitesse u , la loi d'Hagen-Poiseuille permet d'écrire le cisaillement moyen au niveau des parois :

$$\tau = \frac{8.\mu.u}{D} \quad (5.15)$$

En considérant les pores formés par l'empilement comme plusieurs canaux cylindriques parallèles de diamètre D_h , on peut remplacer l'équation 5.12 et 5.13 dans 5.15 :

$$\tau = \frac{8\mu}{D_h}.u = 8\mu.\frac{1}{\left(\frac{2}{3}.\frac{\epsilon}{(1-\epsilon)}.d\right)}.\left(\frac{u_0.T}{\epsilon}\right) \quad (5.16)$$

Soit la valeur du cisaillement moyen au sein de l'empilement :

$$\tau = 12\mu.\frac{(1 - \epsilon)}{\epsilon^2}.\frac{u_0.T}{d} \quad (5.17)$$

On obtient une valeur du cisaillement dépendant de la vitesse du fluide en amont de l'empilement, du diamètre des microsphères, de la tortuosité et de la porosité du milieu.

Pour une porosité et une vitesse données, le cisaillement diminue lorsque le diamètre des microsphères augmente, ce qui est cohérent car le diamètre des pores augmente. De même, pour une vitesse donnée et une dimension de sphères fixée, le cisaillement diminue avec l’augmentation de la porosité car le diamètre caractéristique des pores augmente.

Afin de valider ce modèle, une expérience de perfusion d’un empilement de sphères et de mesure du cisaillement sera réalisée.

5.2.2 Les variations locales de vitesse

L’analyse de l’écoulement au sein des empilements de sphères peut être réalisée numériquement ou expérimentalement. Les techniques utilisées permettent de simuler ou mesurer les vitesses du fluide au sein du milieu poreux permettant d’étudier l’écoulement.

Les modèles numériques comme la méthode des éléments finis (FEM pour Finite Element Method), la méthode des volumes finis (FVM pour Finite Volume Method) ou la méthode de Lattice-Boltzmann sont généralement utilisés pour résoudre les équations de la mécanique des fluides dans les milieux poreux. Parmi ces techniques de simulation, la méthode de Lattice-Boltzmann est la plus efficace pour l’étude de l’écoulement au sein de géométries irrégulières [369]. C’est pourquoi elle est généralement utilisée pour l’étude de l’écoulement au sein des empilements aléatoires de sphères, étant donné la complexité des structures formées.

De nombreuses études analysent l’écoulement au sein des empilements pour des nombres de Reynolds supérieurs à 1 où le domaine d’écoulement n’est plus laminaire linéaire [370, 371]. Pour nos applications, le nombre de Reynolds est beaucoup plus faible et inférieur à 1. Des exemples d’études menées sur l’écoulement au sein d’empilement de sphères aléatoires sont présentés Table 5.3.

Comme précisé précédemment, le régime d’écoulement dépend du nombre de Reynolds. Pour un empilement de sphères, le nombre de Reynolds dépend de la vitesse moyenne en amont de l’empilement, le diamètre des particules, la nature du fluide et la porosité (Equation 5.14). Pour un empilement de sphères monodisperses, la porosité est indépendante du diamètre des particules mais dépend de l’agencement de sphères. Ainsi, le diamètre des particules n’est pas spécifié dans les modélisations numériques. Seul le nombre de Reynolds, la nature du fluide et la porosité sont fixés. C’est le nombre de Reynolds qui importe sur le régime d’écoulement. L’étude de l’écoulement au sein d’un empilement aléatoire compact de sphères de diamètre D perfusé par un fluide à la vitesse u et de l’écoulement au sein d’un empilement aléatoire compact de sphères de diamètre $10D$ perfusé par un fluide à la vitesse $u/10$ est identique. Ainsi, afin de prédire l’écoulement au sein de notre configuration, nous pouvons nous comparer uniquement aux études se plaçant à un nombre de Reynolds identique.

Densité de probabilité

Comme les vitesses au sein d’un tel environnement sont variables, les analyses sont souvent menées par des mesures statistiques. La densité de probabilité des vitesses per-

Tableau 5.3 – Etudes calculant ou mesurant la vitesse des fluides au sein d'un empilement de sphères aléatoire.

Nombre de Reynolds	Techniques	Débit	$D_{sphères}$	$\bar{u}_{interstitielle}$	Remarque	Référence
20 - 3220	PIV		12,7 mm		Écoulement de Stokes à $Re < 40$ Transition régime de Stokes / régime interstitielle pour $40 < Re < 250$ Transition régime inertielle / régime turbulent pour $250 < Re < 1500$	[372]
19,3	MRI		5 mm	3,85 mm/s	Écoulement inhomogène Peu de régions stagnantes	[373]
3,77	PIV	80 mL/min	15 mm		Écoulement laminaire $u_{interstitiel} < 4. < u >$	[374]
0,2 - 34	LB simulation			normalisé	Vitesse interstitielle < 5 vitesse moyenne	[375]
0,36 - 1,8	NMR	1,5-7,3 mL/min	800 μm	1,3-6,7 mm/s	à vitesse élevée, la caractérisation est proche de la résolution des équation de Stke ads un empilement de sphères aléatoire Vitesse longitudinale < 5 fois la vitesse moyenne	[376]
$< 0,1$	μPIV	1-100 $\mu\text{L}/\text{min}$	400 μm	200 $\mu\text{m}/\text{s}$	Vitesse interstitielle < 6 vitesse moyenne	[377]
	μPIV	40-100 $\mu\text{L}/\text{min}$	200 μm	117-246 $\mu\text{m}/\text{s}$	Pas de zones de recirculation Pas de vitesse négative Taille de pore de l'ordre de 50 μm Vitesse longitudinale jusqu'à 3 fois vitesse moyenne	[269]
$< 10^{-3}$	μPIV	200 $\mu\text{L}/\text{h}$	32-75 μm	15-34 $\mu\text{m}/\text{s}$	Écoulement non aléatoire dans un empilement aléatoire Zone de vitesse atteignant jusqu'à 12Uo	[378]

met d'observer les différentes vitesses présentes au sein de l'empilement de sphères. A l'image d'un histogramme, la fonction de densité de probabilité représente la fréquence d'apparitions d'éléments pour une valeur donnée. Pour l'étude de l'écoulement, elle est intéressante afin d'observer les variations de vitesses au sein du milieu. Elle est généralement normalisée par la valeur moyenne de la vitesse interstitielle. Ainsi, la densité de probabilité des vecteurs vitesses normalisées renseigne sur la variation maximale de vitesse.

Etudes de la littérature similaires à notre cas

Par rapport à notre application, nous nous intéressons aux études menées sur des nombres de Reynolds faibles au sein d'empilement aléatoire compact (ϵ proche de 0.36). Lebon *et al.* effectuent une étude proche de la nôtre [376]. Dans leur étude, ils comparent les calculs numériques et les données expérimentales de l'écoulement au sein d'un empilement compact de sphères de 800 μm de diamètre [376]. L'empilement est perfusé avec un débit variant de 1.5 à 7.3 mL/min générant une vitesse interstitielle de 1.3 et 6.7 mm/s, soit un nombre de Reynolds de 0.36 et 1.8. Hormis leur taille de sphère plus de deux fois supérieures à notre étude, la porosité et le nombre de Reynolds utilisé sont proches de notre application. L'écoulement global s'effectue dans la direction de z .

La densité de probabilité normalisée de la composante longitudinale de la vitesse obtenue par calcul numérique et mesure expérimentale est présentée Figure 5.15. On observe

un pic de fréquence des vitesses proche de $0.3 \langle v_z \rangle$. Le spectre des vecteurs vitesses est large, avec certaines vitesses locales atteignant jusqu’à $6 \langle v_z \rangle$.

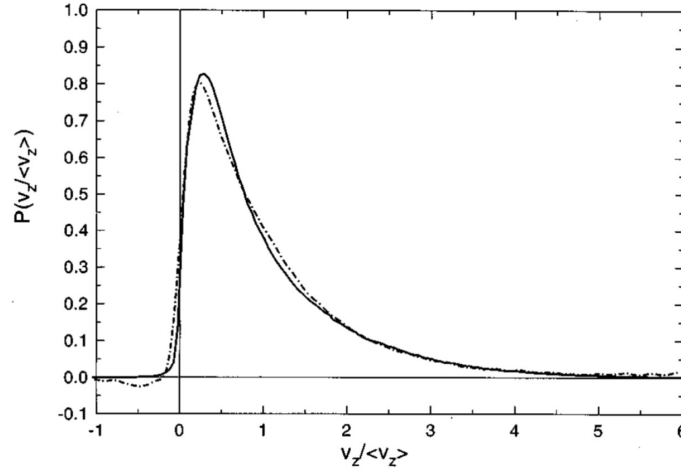


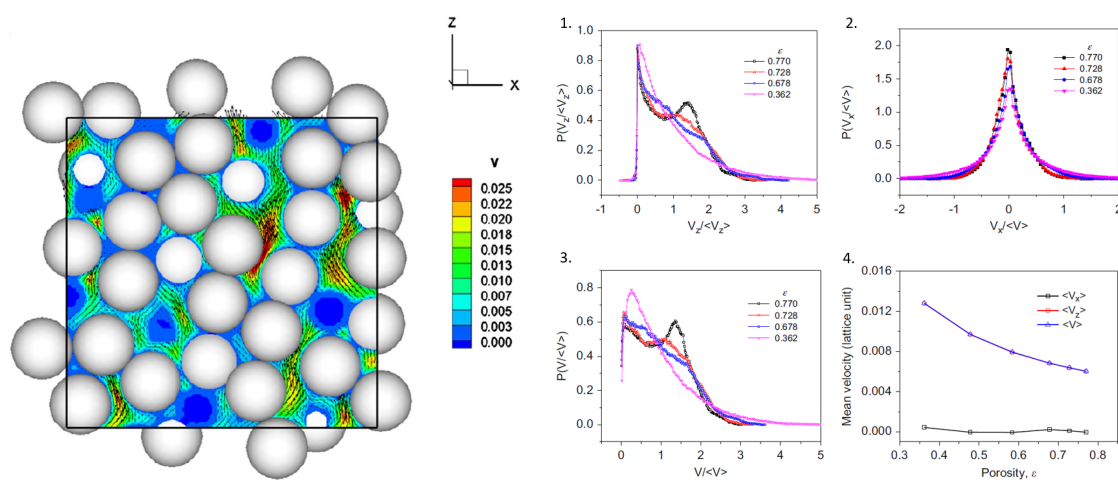
FIGURE 5.15 – Distribution de vitesse normalisée obtenue par simulation de Lattice Boltzmann (trait plein) et par les mesures expérimentales (trait pointillé) au sein d’un empilement aléatoire compact ($\epsilon = 0.36$) de sphères de diamètre $D = 800 \mu\text{m}$ pour un écoulement interstitiel de 3.4 mm/s s’écoulant en z ($Re = 0.9$). [376]

Rong et al. simulent l’écoulement au sein d’un empilement aléatoire de sphères par la méthode de Lattice-Boltzmann pour différentes porosités à un faible nombre de Reynolds [375, 349]. Le champ de vitesse obtenue numériquement au niveau d’une section d’un empilement pour $\epsilon = 0.36$ et $Re = 0.2$ révèle la variation des vecteurs vitesses au sein de l’empilement (Figure 5.16a). En variant les paramètres de la modélisation, ils comparent l’impact de la porosité sur la distribution des vecteurs vitesses normalisés. On observe Figure 5.16b.1 que la distribution de la composante longitudinale de la vitesse pour une porosité de 0.362 est semblable à celle obtenue par Lebon *et al.* avec un pic de maximum de densité proche de 0, et une décroissance pour les fortes vitesses avec un maximum au niveau de $5 \langle v_z \rangle$. Le tracé de la densité de probabilité de la norme des vecteurs vitesses a la même allure, avec un pic légèrement décalé par rapport à 0 (Figure 5.16b.3).

Comme l’espace inter-billes est tortueux, les vecteurs vitesses possèdent une composante transverse à la direction globale d’écoulement. Cette composante dépend des géométries de l’empilement. Comme l’écoulement global s’effectue dans la direction longitudinale, la valeur moyenne de la composante transverse est nulle. C’est pourquoi la densité de probabilité de la composante transverse de la vitesse est centrée en 0 (Figure 5.16b.2). Dans leur étude, Rong *et al.* mettent en avant le fait que le pic de distribution diminue avec la porosité de l’empilement. Ce point illustre le fait que pour un empilement compact, la tortuosité des pores grandit, ce qui augmente la composante radiale de la vitesse. Ils montrent également que la valeur de la vitesse interstitielle moyenne augmente avec la diminution de la porosité (Figure 5.16b.4). Ce résultat est cohérent avec l’équation 5.13

présentée précédemment.

De plus, Rong *et al.* identifient différentes structures de l'écoulement au sein de l'empilement (Figure 5.17). L'écoulement de type canal correspond au cas où les fluides émergent de différents pores dans un même pore qui se scinde ensuite en plusieurs pores. La pression du fluide est ainsi répartie dans plusieurs sorties. Lorsque un écoulement de forte vitesse arrive normalement au niveau d'une bille, le fluide s'écoule et recouvre la surface : c'est l'écoulement de recouvrement. Le troisième type d'écoulement correspond à l'écoulement en jet où le fluide pénètre avec une forte vitesse au sein d'un pore unique. Au niveau des rétrécissements d'un pore, la vitesse du fluide augmente localement, causant un fort effet de cisaillement sur les billes environnantes. Différents types d'écoulements sont donc présents au sein d'un empilement de sphères ce qui génère des contraintes de cisaillement variées.



(a) Champ de vitesse au niveau d'une section longitudinale centrale d'un empilement de sphères pour un nombre de Reynolds de 0.2 et une porosité de $\epsilon = 0.362$.

(b) Distribution de la densité de probabilités vitesses normalisées pour différentes porosités avec $Re = 1$. 1. Vitesse dans la direction de l'écoulement. 2. Composantes transverses. 3. Vitesse totale. 4. Vitesse moyenne.

FIGURE 5.16 – Champ de vitesse et fonctions de probabilité de vitesses obtenues au sein d'un empilement aléatoire de sphères par la méthode de Lattice-Boltzmann. [375]

L'utilisation de la méthode de μ PIV permet d'obtenir des champs de vecteurs au sein d'un empilement de sphères. Sen *et al.* utilisent cette technique pour mesurer la vitesse interstitielle au sein d'un empilement de sphères au niveau des parois [377, 269]. Un empilement aléatoire de sphères de verre de $200 \mu\text{m}$ de diamètre est formé au sein d'un canal microfluidique de section rectangulaire $4.5 * 4.5 \text{ mm}^2$. L'empilement est perfusé avec un débit de $100 \mu\text{L}/\text{min}$, soit une vitesse moyenne en amont de l'empilement de $u = 82 \mu\text{m}/\text{s}$. Le champ de vitesse est mesuré près de la paroi et obtenu par μ PIV (Figure 5.18a). Leur construction forme un empilement lâche de porosité $\epsilon = 0.40$. On peut ainsi en déduire la

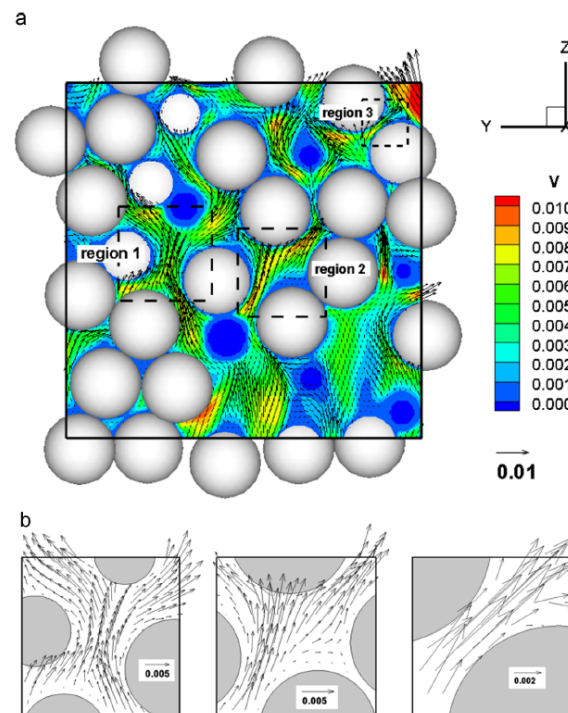


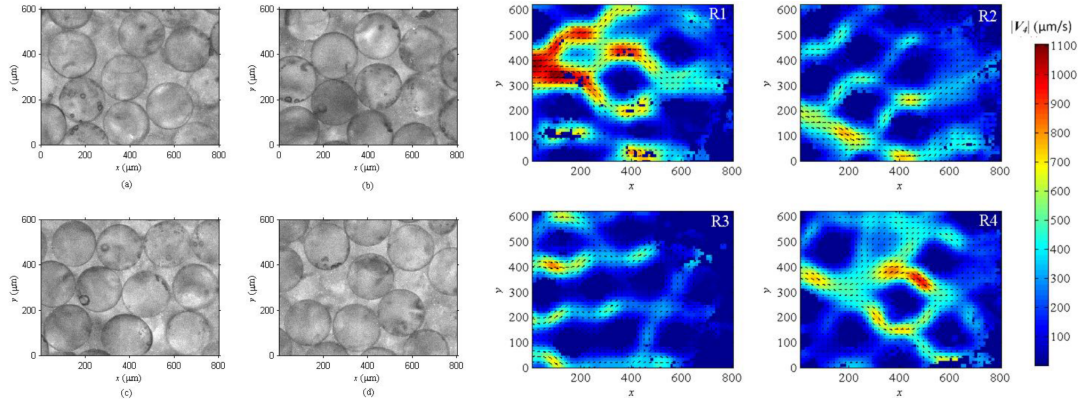
FIGURE 5.17 – Les différents types d'écoulement dans un empilement de sphères aléatoires. [349]

(a) Champ de vitesse pour une porosité $\epsilon = 0.36$.

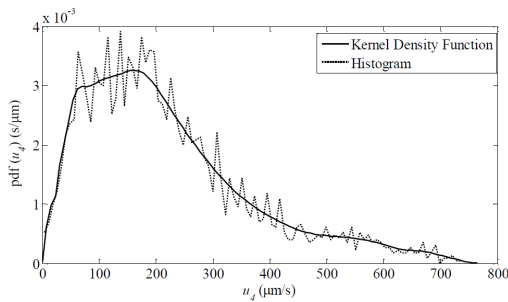
(b) Les structures de l'écoulement dans différentes régions du champ de (a). Gauche : écoulement de type canal - Milieu : écoulement de recouvrement - Droite : écoulement en jet.

vitesse moyenne interstitielle : $u_0 = u/\epsilon = 205 \mu\text{m}/\text{s}$ (en négligeant la tortuosité).

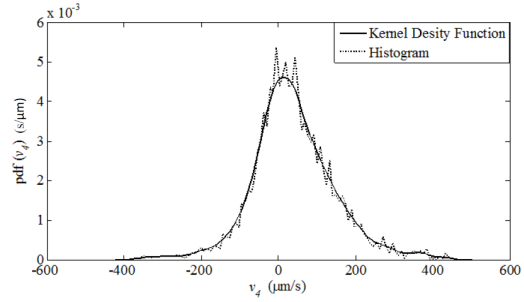
On peut voir que le champ de vitesse est très variable selon les régions. Dans certaines zones, la vitesse atteint des valeurs de $1000 \mu\text{m}/\text{s}$, soit 5 fois la valeur de u_0 (Figure 5.18b). La distribution des vitesses fournit des informations sur les vitesses rencontrées au sein de l'écoulement. Dans la région R2, la courbe de densité de probabilité de vitesse montre un pic de vitesse proche de $200 \mu\text{m}/\text{s}$ avec des vitesses atteignant $750 \mu\text{m}/\text{s}$ (Figure 5.18c). On remarque qu'on retrouve la valeur interstitielle moyenne calculée pour la vitesse de probabilité maximale. La courbe de probabilité de vitesse normalisée est calculée dans les 4 régions présentées (Figure 5.18e). Elle permet de montrer que la majorité des vitesses de chaque région est comprise entre 0 et 3 fois la vitesse moyenne. Certaines vitesses atteignent cependant jusqu'à presque 6 fois la vitesse moyenne, mais ces cas sont isolés. Là encore, la densité de probabilité des vitesses transverses est centrée autour de 0.



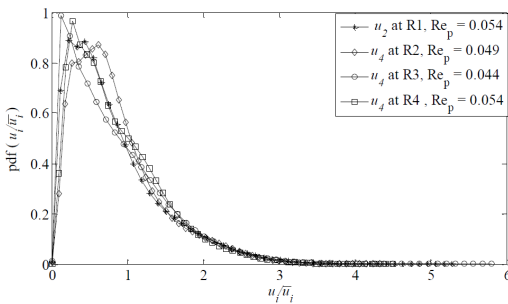
(a) Structure des pores dans différentes régions. (b) Champ de vitesse associé à chacune des régions.
 (a) Région R1. (b) Région R2. (c) Région R3. (d) Région R4.



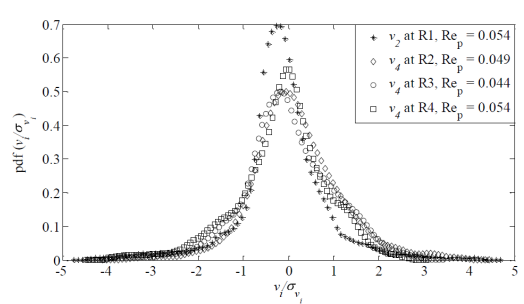
(c) Densité de probabilité de vitesse longitudinale de la région R2.



(d) Densité de probabilité de vitesse transverse de la région R2.



(e) Densité de probabilité de vitesse longitudinale normalisée des 4 régions.



(f) Densité de probabilité de vitesse transverse normalisée des 4 régions.

FIGURE 5.18 – Champ et distribution des vitesses obtenus par μ PIV dans l’étude de Sen *et al.* [377]

5.3 Caractérisation expérimentale de l'écoulement : μ PIV

La mesure de l'écoulement au sein d'une géométrie poreuse complexe est difficile à mener expérimentalement [379]. L'observation d'un empilement de sphères, même transparentes, est néanmoins difficile à cause des différences d'indice de réfraction entre le fluide et les sphères [380]. De nombreuses techniques d'observation et visualisation des écoulements microfluidiques existent, mais sont généralement appliquées pour l'étude de l'écoulement dans des milieux macroporeux aux dimensions de pores plus élevées que celles obtenues dans notre empilement. Sinton présente l'ensemble de ces techniques dans sa revue [381]. Peu d'études de caractérisation de l'écoulement dans les empilements de sphères de diamètre compris entre 200 et 400 μm sont disponibles 5.3. Akanji *et al.* ont développé une méthode numérique afin d'étudier l'écoulement au sein de micro-pores [382], mais il existe un manque d'études expérimentales vérifiant la validité des modèles numériques.

5.3.1 Réalisation de l'empilement

Un empilement est réalisé par injection de microsphères d'alginate et collagène au sein d'une chambre microfluidique comprenant un filtre mécanique de rétention des microsphères. Lors des différentes expériences, plusieurs compositions de biopolymères ont été utilisées entre des microsphères d'alginate pur et des microsphères produites à partir de mélange de collagène et alginate.

5.3.1.1 Dispositif de rétention des microsphères

Les chambres microfluidiques sont conçues dans des cartes plastiques de COC. Des canaux microfluidiques sont usinés dans les cartes et reliés aux fluides de perfusion. Ces cartes intègrent une chambre dans laquelle l'empilement de sphères sera formé.

Un dispositif de rétention est indispensable et permet de retenir les microsphères au niveau de la chambre microfluidique, tout en laissant passer l'écoulement de fluide. Plusieurs techniques d'intégration d'un filtre mécanique au sein de la carte microfluidique ont été réalisées et testées.

Filtre fritté

La première stratégie de rétention des microbilles a été l'insertion d'un filtre de porosité inférieure à 10 μm en aval de la chambre microfluidique (Figure 5.19). Ce filtre a été intégré par usinage de canaux microfluidiques dans différentes plaques de COC, puis empilement et collage de ces plaques les unes sur les autres.

La rétention des billes est efficace avec ce filtre, un empilement peut ainsi être formé dans la chambre. Cependant, il engendre une grosse perte de charge. De plus, l'empilement des microsphères se forme au-dessus du filtre non transparent, ce qui perturbe l'observation optique de l'empilement. Comme nous souhaitons à terme observer le développement des cellules endothéliales dans notre système, nous préférons une solution permettant l'observation.

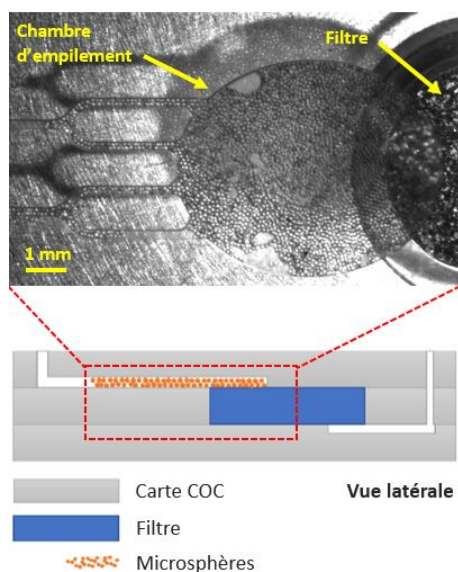


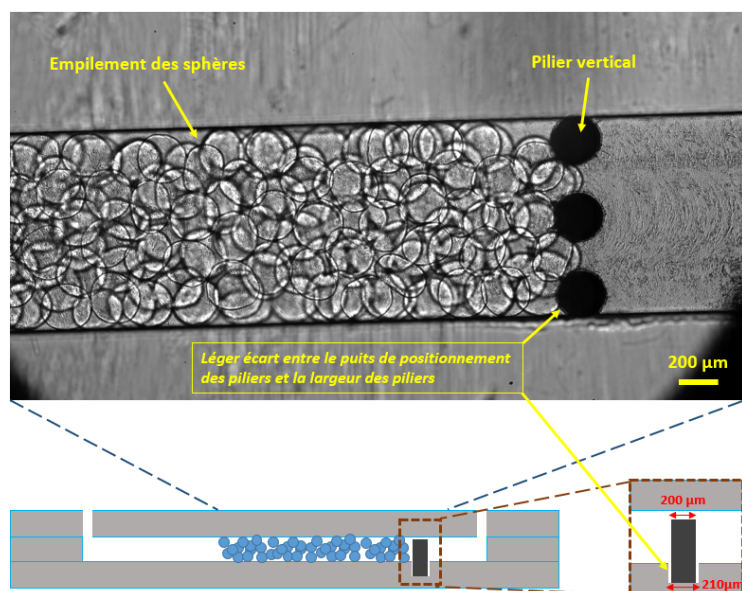
FIGURE 5.19 – Chambre retenant des billes de polystyrènes de $200\ \mu\text{m}$ au sein d’une chambre de forme ovale.

Piliers verticaux

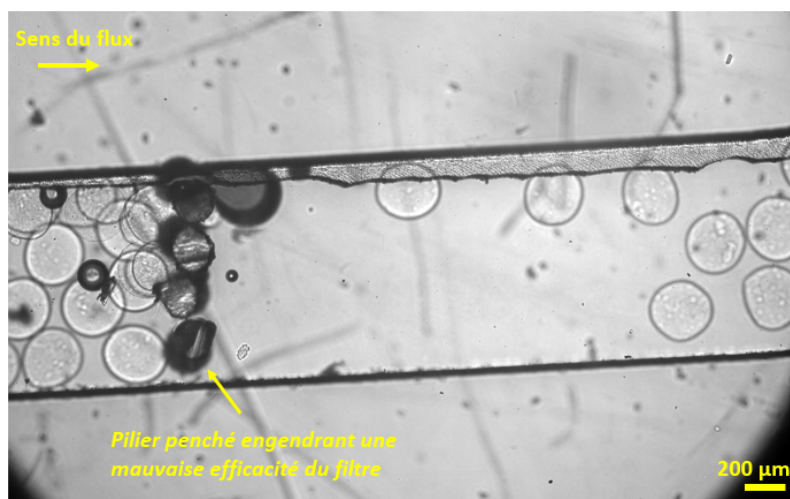
La seconde technique de rétention consiste en l’insertion de piliers verticaux espacés de $150\ \mu\text{m}$. Les piliers utilisés mesurent $200\ \mu\text{m}$ de diamètre. Des puits de $210\ \mu\text{m}$ de diamètre et $300\ \mu\text{m}$ de profondeur sont creusés au moyen d’un forêt sur une largeur du canal microfluidique avec un espacement de $140\ \mu\text{m}$ entre les puits (Figure 5.20a). Les piliers mesurent $200\ \mu\text{m}$ de diamètre et $1200\ \mu\text{m}$ de longueur. Ces piliers sont glissés dans les puits avant la fermeture de la carte microfluidique. Les piliers verticaux sont placés sur la quasi-totalité de l’épaisseur de la chambre. Cette technique s’avère être un bon moyen de rétention des microsphères d’environ $300\ \mu\text{m}$ de diamètre (Figure 5.20a).

Cependant, les piliers sont commandés et la précision sur la longueur des piliers n’est pas suffisante afin d’ajuster précisément la longueur à l’épaisseur de la chambre. Ainsi un écart entre les piliers et la face supérieure du canal microfluidique réside. Lorsque cet écart est trop important, des microsphères peuvent traverser le filtre mécanique. De plus, la dimension des puits de positionnement ne correspond pas exactement au diamètre des piliers. La situation est schématisée dans la boîte en bas à droite de la Figure 5.20a. L’écart entre le diamètre des puits de positionnement et ceux des piliers peut provoquer une non-verticalité des piliers lors de la conception des cartes. Certains piliers se retrouvent alors penchés lors de leur insertion, ce qui réduit l’efficacité du filtre. L’espacement des piliers n’est pas homogène et permet à certaines billes de traverser le filtre. C’est la situation décrite sur la photographie de la Figure 5.20b.

Le placement des piliers est une technique nécessitant une précision de fabrication qui limite la reproductibilité des cartes produites. Nous avons donc envisagé une autre solution de développement d’un filtre de rétention des microsphères.



(a) Chambre retenant des microsphères de SLM1-Col3 de 300 μm grâce à des piliers de 200 μm espacés de 150 μm .



(b) Photographie d'un filtre défaillant causé par le penchement des piliers verticaux.

FIGURE 5.20 – Utilisation de piliers espacés en tant que filtre de rétention.

Marche

La troisième technique de rétention utilise une marche. Ce qu'on appelle marche est en fait un canal de largeur égale à celle de la chambre et d'épaisseur $150\ \mu\text{m}$. Le filtre est ainsi conçu au moment de l'usinage. La géométrie de la chambre est creusée dans la plaque de COC par fraisage. Un bloc de COC est laissé en sortie de la chambre et est creusé sur une épaisseur de $150\ \mu\text{m}$ sur la face supérieure et inférieure. La carte est ensuite refermée par scellement de chaque côté. Une vue latérale schématisée est visible Figure 5.21. L'ouverture de $150\ \mu\text{m}$ permet la rétention des microsphères de $300\ \mu\text{m}$. Comme on peut le voir, le filtre développé est efficace. Nous aurions préféré l'utilisation des piliers qui permet la formation d'un filtre avec des pores plus larges perturbant moins l'écoulement, mais le manque de reproductibilité de la technique des piliers lié à la simplicité de conception de la marche mécanique nous a fait préférer cette dernière solution.

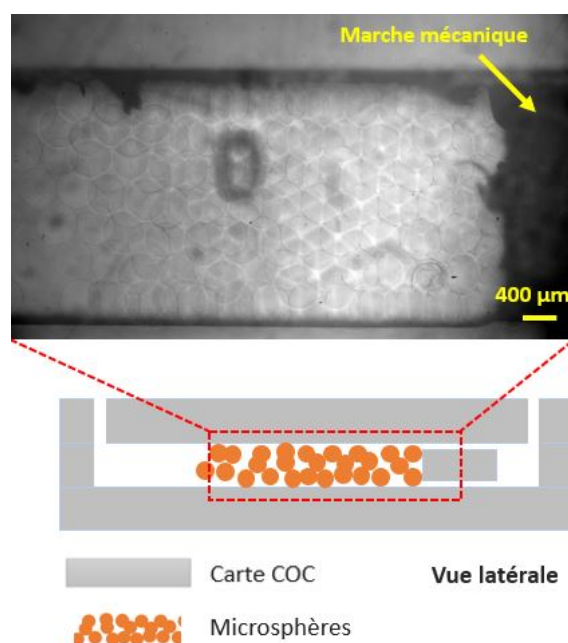


FIGURE 5.21 – Chambre de rétention des microsphères de SLM1-Col3 de $300\ \mu\text{m}$ grâce à deux ouvertures de $150\ \mu\text{m}$ d'épaisseur.

5.3.1.2 Formation de l'empilement

Afin d'étudier l'écoulement au sein de notre empilement de sphères, des microsphères sont injectées au sein d'une carte microfluidique contenant une marche mécanique.

Forme de la chambre

Plusieurs géométries de chambre ont été développées durant la thèse. Les premières géométries ont été conçues en se basant sur l'allure des chambres en diamant développées par l'équipe de Hugues [61]. Des géométries ovales ou hexagonales ont été testées afin de

reproduire l'élargissement, rétrécissement de leur chambre microfluidique (Figure 5.22).

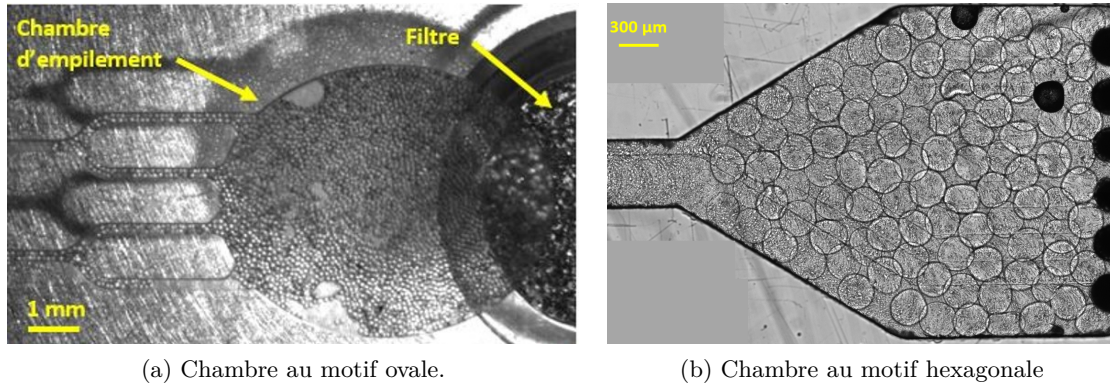


FIGURE 5.22 – Différentes architectures de chambre.

Cependant, nous souhaitons perfuser notre chambre à l'aide d'une pompe péristaltique, afin de développer un circuit microfluidique fermé. La pompe péristaltique impose un débit qui est identique le long d'un canal en série. La vitesse u de l'écoulement dépend du débit Q dans le canal ainsi que de la section A du canal via la relation : $u = Q/A$. Ainsi, un élargissement de canal provoque une augmentation de la section, et donc une diminution de la vitesse globale au sein du canal. Comme les écoulements sont de natures complexes au sein d'un empilement de sphères, nous décidons plutôt de concevoir des chambres microfluidiques de section constante. Un canal microfluidique de section constante est usiné et la marche d'ouverture $150\mu\text{m}$ est construite au sein du canal.

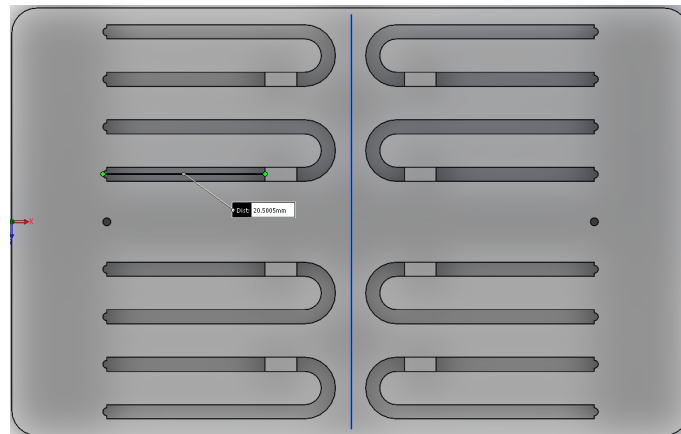


FIGURE 5.23 – Vue aérienne de la carte microfluidique utilisée comportant 8 motifs composés d'un canal droit et d'un filtre mécanique.

Une vue du dessus de la carte microfluidique est disponible Figure 5.23. 8 motifs de canaux sont usinés au sein d'une même cartouche microfluidique. La section du canal est de $1800 \times 1000 \mu\text{m} \times \mu\text{m}$ et la longueur du canal d'empilement est de 20 mm. Chaque motif possède la forme d'un U afin de correspondre avec les puits d'insertion du dispositif

Flowpad qui permet de fixer les connecteurs microfluidiques au niveau d’une largeur de la carte. L’empilement est formé sur le côté linéaire de la marche et l’écoulement est initié de sorte à plaquer l’empilement contre la marche.

Réalisation de l’empilement

Des microsphères SLM1Col3 sont produites à l’aide du dispositif Centricaps (Section 4.3.2). Les propriétés des microsphères sont mesurées par analyse d’images via le logiciel ImageJ. Le diamètre des microsphères est de $302.5 \pm 14.4 \mu m$. Le coefficient de variation est de 4.74% et la sphéricité est de 0.94. Une photographie des microsphères est présentée Figure 5.24. De par le diamètre des microsphères et l’épaisseur de la chambre microfluidique, 3-4 couches de microsphères peuvent être disposées dans le canal.

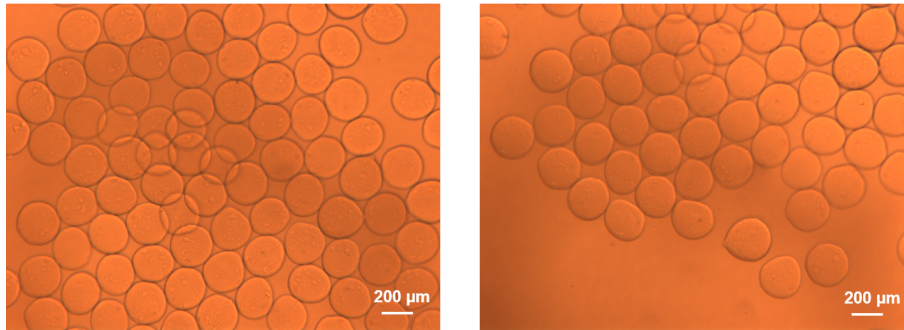


FIGURE 5.24 – Microsphères injectées dans la chambre microfluidique formant l’empilement dans lequel est réalisé la μPIV .

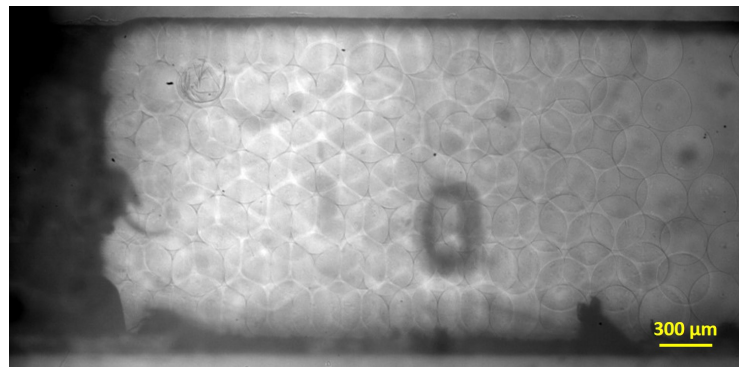
Les microsphères sont injectées délicatement avec une pipette dans la chambre microfluidique et un empilement de sphères est formé. La chambre est observée par transmission à l’aide d’un microscope droit. Comme les sphères sont transparentes, il est possible d’observer les différentes couches de sphères. Cependant, la visualisation des couches est perturbée par la diffraction des microsphères des autres couches hors plan focal. Néanmoins, il est possible de faire la focalisation du microscope au niveau de chaque couche afin de distinguer les microsphères (Figure 5.25). De cette manière, il est possible de compter le nombre de microsphères au sein de chaque couche, et donc au sein de notre empilement.

Porosité

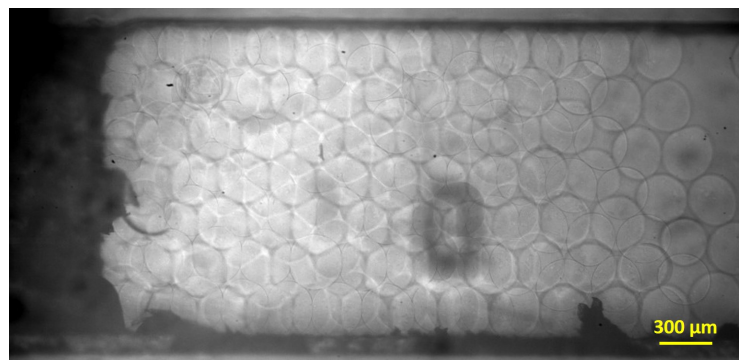
Afin de déterminer le cisaillement théorique à l’aide de la formule établie équation 5.17, il nous faut déterminer la porosité de notre empilement. Comme nous ne disposons pas de technique de mesure de la porosité, nous évaluons la porosité par comptage des microsphères au sein d’un volume défini. La porosité est définie par :

$$\epsilon = 1 - C = 1 - \frac{N \cdot V_{sphère}}{V_{total}} \quad (5.18)$$

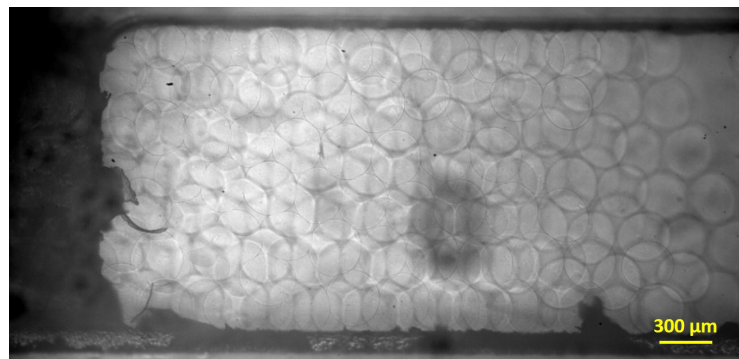
avec N le nombre de microsphères contenues dans le volume total.



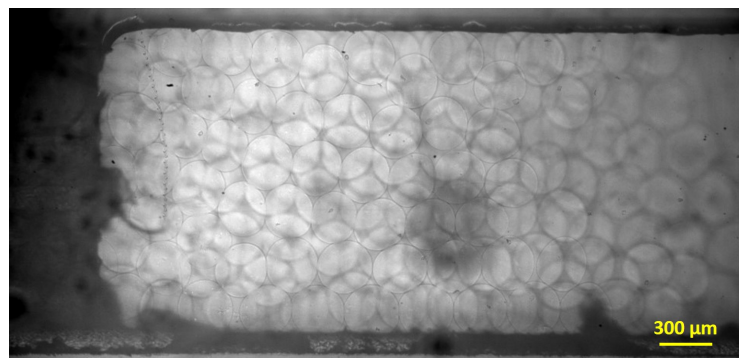
(a) 1ère couche de microbilles



(b) 2nde couche



(c) 3ème couche



(d) 4ème couche

FIGURE 5.25 – Différentes architectures de chambre

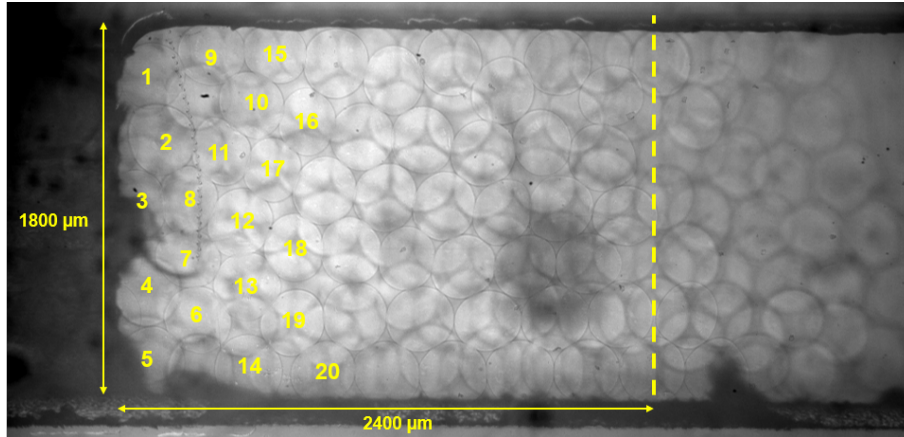


FIGURE 5.26 – Technique de comptage de microsphères par plan de focalisation afin d’estimer la porosité.

Prenons en exemple l’empilement de la Figure 5.25. Nous faisons l’hypothèse que les microsphères sont totalement sphériques, indéformables et homogènes de diamètre $d = 302.5 \mu m$. Pour définir le nombre de microsphères, nous focalisons le microscope au niveau de chaque couche de microsphères et comptons les microsphères contenues dans un volume défini (Figure 5.24). Le volume est délimité par la surface du canal et une longueur de 2,4 mm en partant de la marche. Le volume est ainsi de : $V_{total} = 1.8 * 2.4 * 1 = 4.32 mm^3$. Lors du comptage, comme la distinction des microsphères entre les couches est difficile, il faut être précautionneux de ne pas considérer une microsphère appartenant à deux couches de focalisation. Un nombre de 219 microsphères est compté au sein du volume de $4.32 mm^3$. La porosité de l’empilement est alors de :

$$\epsilon = 1 - \frac{219 \frac{\pi \cdot d^3}{6}}{4.32} = 0.265 \quad (5.19)$$

Nous obtenons donc une porosité de 26.5% proche de l’hexagonal compact. Une telle porosité n’est pas atteignable pour l’empilement de sphères monodisperses indéformables. Cependant, nos sphères sont en réalité déformables et la compression des microsphères est observée lors de la perfusion du système. C’est cette raison qui nous permet d’obtenir un empilement de microsphères proche de l’hexagonal compact. La structure hexagonale compacte est observable grâce à la diffraction (Figure 5.27). Lorsque l’on observe 3 microsphères du plan de focalisation en contact, on observe les contours clairs d’un hexagone au travers des 3 microsphères. De plus, lorsqu’on observe une microsphère, on peut distinguer les 6 contacts avec les microsphères alentour du même plan ainsi que les 3 contacts avec les microsphères du plan supérieur. En reportant cette agencement au niveau des plans plus profonds, une seule est en contact avec 12 autres : c’est la configuration de l’agencement hexagonal compact.

Bien que la déformabilité des microsphères permette d’obtenir des empilements plus denses que pour les empilements de sphères indéformables, elle constitue un problème

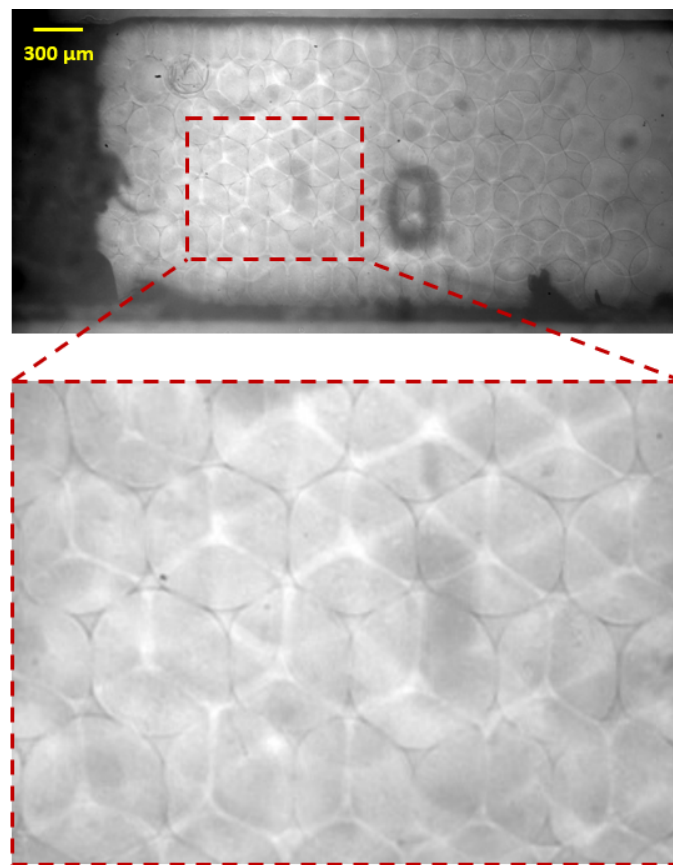


FIGURE 5.27 – Observation du réseau hexagonal par diffraction de la lumière au travers des couches de microsphères.

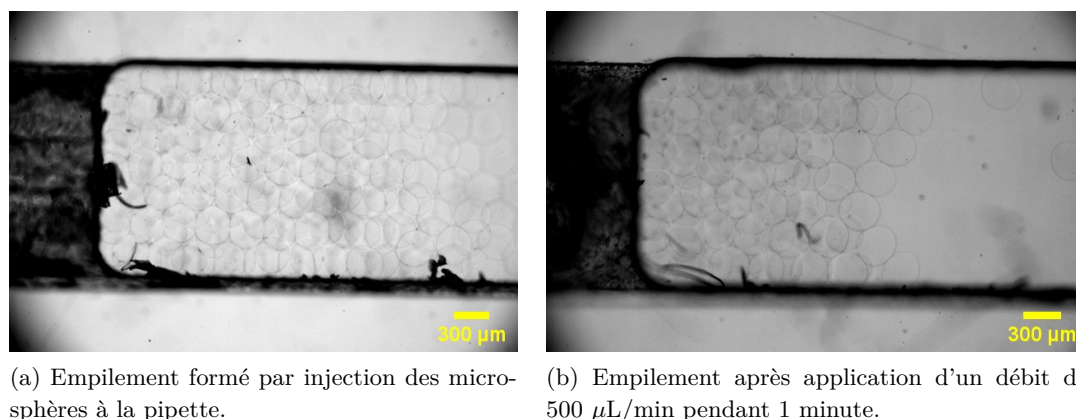


FIGURE 5.28 – Microsphères traversant le filtre pour un débit trop important.

dans le cas de notre application. En effet, pour des forts débits au sein de l'empilement, la pression imposée sur l'empilement cause une compression des microsphères qui traversent notre filtre mécanique. On peut voir Figure 5.28 une photographie de l'empilement avant et après application d'un écoulement au débit de 500 $\mu\text{L}/\text{min}$. De ce fait, l'expérience de μPIV est réalisée avec un débit plus faible de 50 $\mu\text{L}/\text{min}$ n'ayant pas provoqué des traversées du filtre, sur l'empilement de la Figure 5.29. La réduction du débit réduit fortement la compacité de l'empilement. Avec ce débit, nous mesurons une porosité de 39% proche de l'empilement aléatoire tassé de sphères incompressibles. Une mesure expérimentale du cisaillement est réalisée sur cet empilement. Nous verrons dans le prochain chapitre que les microsphères dont la surface est recouverte d'une couche de cellules sont plus rigides. La structure des empilements obtenus avec des microsphères recouvertes est plus proche de la structure d'empilement aléatoire, même avec des débits importants, ce qui justifie les mesures faites sur cet empilement.

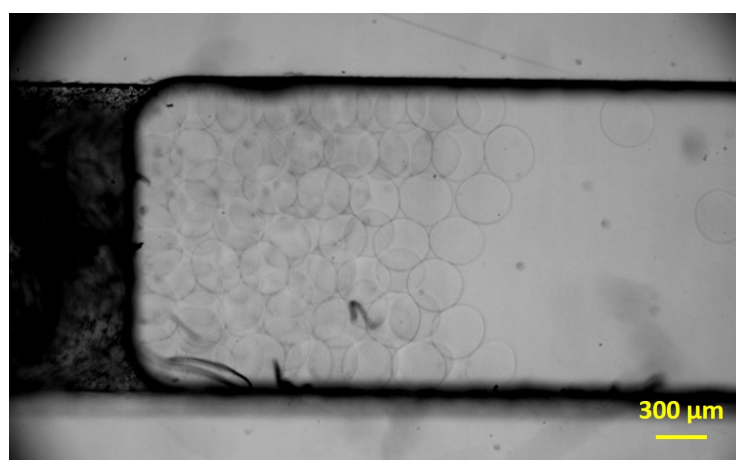


FIGURE 5.29 – Empilement sur lequel est effectué la μPIV .

5.3.2 Mesure du cisaillement : μ PIV

La technique μ PIV a été utilisée afin de caractériser l'écoulement au sein de l'empilement. Cette technique présente les avantages d'être non-invasive, c'est-à-dire que l'écoulement n'est pas perturbé par la mesure, elle permet de mesurer un champ large de l'écoulement et elle apporte des informations quantitatives de vitesse. Cependant le milieu nécessite d'être transparent pour permettre la visualisation des particules.

Une expérience de μ PIV se déroule en deux temps : une première étape d'acquisition des images de déplacements de particules, et une seconde étape d'analyse de ces images afin d'attribuer un vecteur vitesse de déplacement à chacune des particules. Le détail de la technique est précisé Section 3.2.3.1

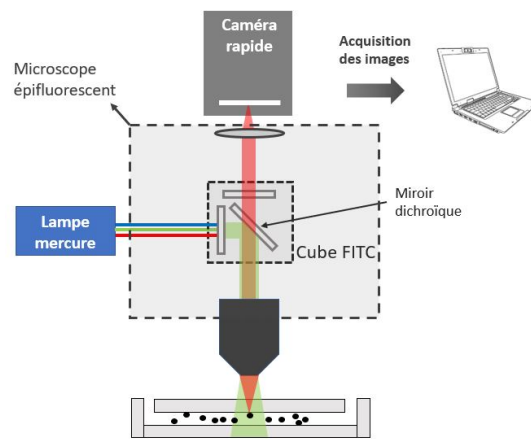
5.3.2.1 Acquisition & traitement des images

Le banc de μ PIV est présenté Figure 5.30. Des particules de traçage sont injectées dans du sérum physiologique perfusé au sein de l'empilement présenté Figure 5.29, à un débit $Q = 50 \mu L/min$. Les particules sont excitées lors de leur passage au sein du plan de focalisation et la fluorescence émise est capturée à l'aide d'une caméra rapide. De par le coût élevé et la complexité d'utilisation, notre dispositif n'utilise pas de source d'excitation laser. Une lampe mercure combinée à un microscope épifluorescent et un filtre FITC permet d'exciter les particules de traçage à la longueur d'onde adéquate (Figure 5.30).

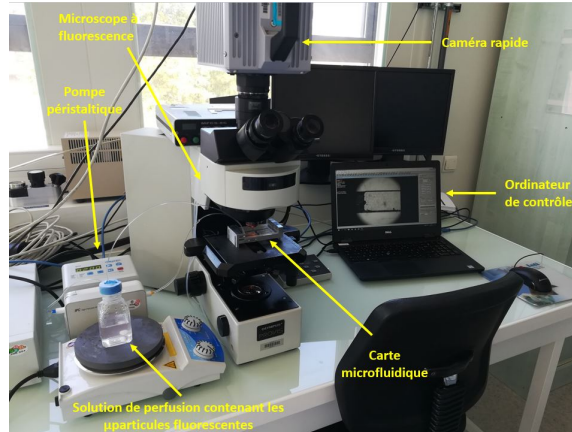
Une des images acquises est montrée Figure 5.31a. De nombreuses particules de traçage restent bloquées au sein de l'empilement et perturbent la visualisation des particules fluorescentes en mouvement. Un traitement d'images est alors effectué afin de soustraire le bruit résiduel des particules coincées aux images d'acquisition. Le but de ce traitement est d'enlever le bruit résiduel des particules immobiles.

Pour cela, un filtre médian est généralement utilisé. Le filtre médian consiste à prendre, pour chaque pixel de position (i,j) , la valeur médiane de ce pixel sur toutes les images. Considérant un pixel de l'image au sein des pores de l'empilement sur lequel n'est positionnée aucune particule de traçage et de niveau de gris n . Sur la plupart des images de l'acquisition, le pixel conserve sa valeur de n . Si à un moment t une particule passe au niveau de ce pixel, sa valeur de niveau de gris augmentera mais repassera à une valeur de n sur les images suivantes, la particule s'étant déplacée. Ainsi, sur l'ensemble des images de l'acquisition, la valeur médiane sur toutes les images de pixel sera n . Cette technique permet de conserver seules les parties fixes d'une série d'images et enlève les objets en mouvement.

Avant l'application de ce filtre, une recalibration est effectuée sur les images car la pompe péristaltique utilisée pour générer l'écoulement produit des perturbations. En effet, ce système de pompe est composé de galets rotatifs qui écrasent un tube souple. A chaque fois qu'un nouveau galet écrase le tube, l'écoulement est légèrement perturbé. Un déplacement des microsphères de l'empilement de l'ordre de 3 à 5 pixels est observé. Ce léger décalage empêche l'application du filtre médian. Le programme de calibration des



(a) Schéma du dispositif optique de μ PIV utilisé.



(b) Photographie du dispositif.

FIGURE 5.30 – Banc expérimental de μ PIV.

images permet de décaler chaque image de quelques pixels afin de compenser la compression et considérer que ces sphères sont fixes.

Après la recalibration, le filtre médian est appliqué. L'image médiane est montrée Figure 5.31b : toutes les particules de traçage en mouvement au sein de l'empilement ont disparu et seules les particules fixes sont conservées. La Figure 5.31d est l'image obtenue après application du filtre médian avec recalibration et la Figure 5.31c est celle obtenue sans recalibration. La recalibration ne permet pas d'éliminer les particules fixes bloquées au niveau de la paroi des microsphères car les microsphères se sont légèrement décalées lors de l'acquisition des images.

L'image médiane est alors soustraite de la série d'acquisition des images ce qui permet de ne conserver sur chaque image, que les particules en mouvement.

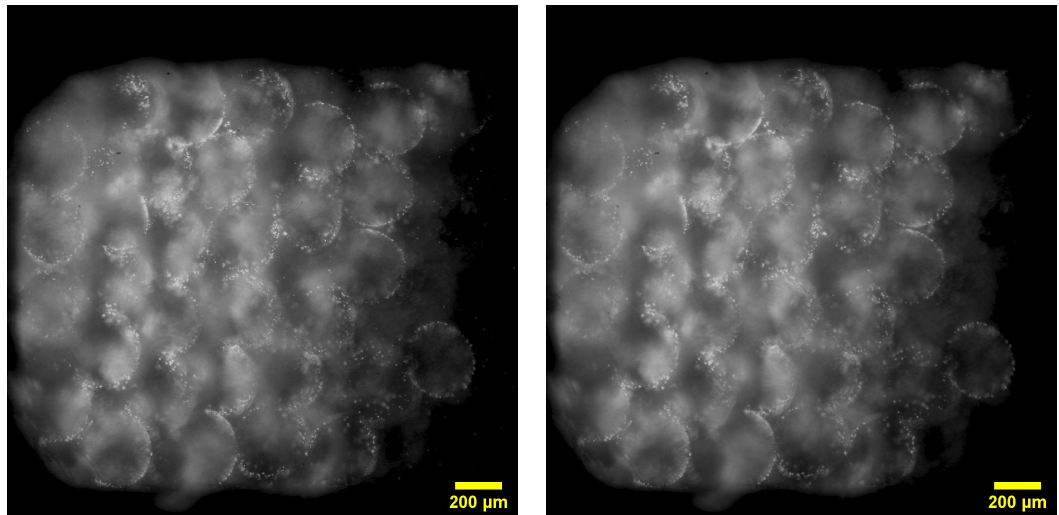
Une augmentation du contraste des images finales traitées permet aussi d'améliorer les calculs de μ PIV. La Figure 5.32 est une comparaison des champs de vitesse obtenus dans l'empilement avant et après traitement des images. Le traitement des images permet d'obtenir un champ de vitesses cohérent sur l'ensemble de l'image. Le cisaillement peut être déduit de ces champs.

5.3.2.2 Champ de vitesses

Afin de valider l'efficacité de notre modèle de μ PIV, nous allons mesurer le champ de vitesse dans le canal en amont de l'empilement et le comparer à la valeur théorique. Dans cette partie, l'écoulement est un écoulement de Poiseuille classique. Pour un débit de 50 μ L/min, la vitesse moyenne u_0 est :

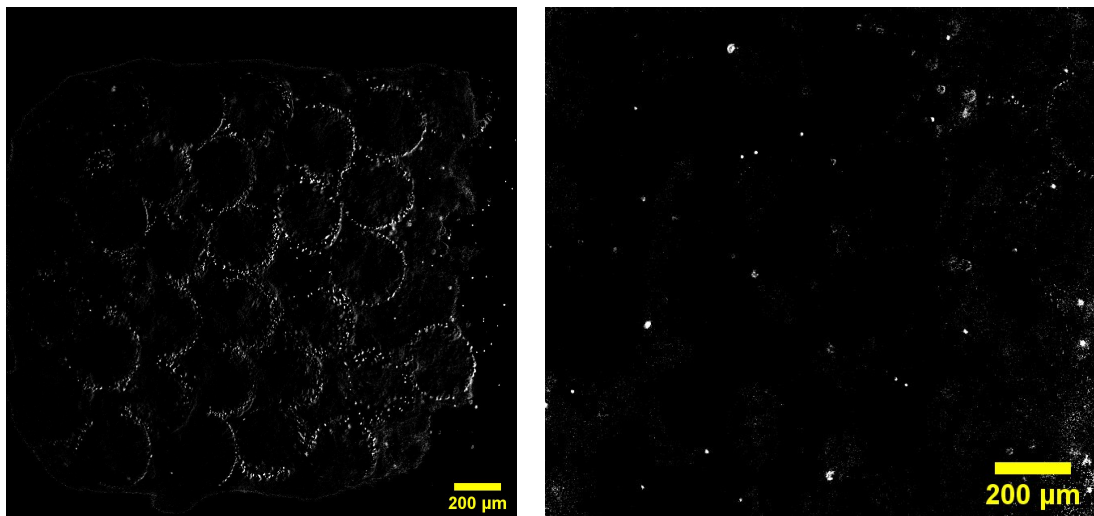
$$u_0 = \frac{Q}{A} = 463 \mu\text{m/s} \quad (5.20)$$

Le champ de vecteur obtenu par μ PIV vérifie un écoulement de Poiseuille avec une vitesse maximale au centre du canal de 650 $\mu\text{m/s}$ (Figure 5.33a) et une valeur moyenne des vitesses de 486 $\mu\text{m/s}$. Le profil coïncide avec les équations de Poiseuille qui prédisent une vitesse maximale au centre du canal de 630 $\mu\text{m/s}$ (Figure 5.33b). La valeur moyenne de la vitesse dans le canal est également retrouvée. Les profils et les normes des vitesses au sein d'un canal rectangulaire coïncident ce qui valide les calculs du programme de μ PIV.



(a) Image fluorescente des particules de traçage au sein de l'empilement.

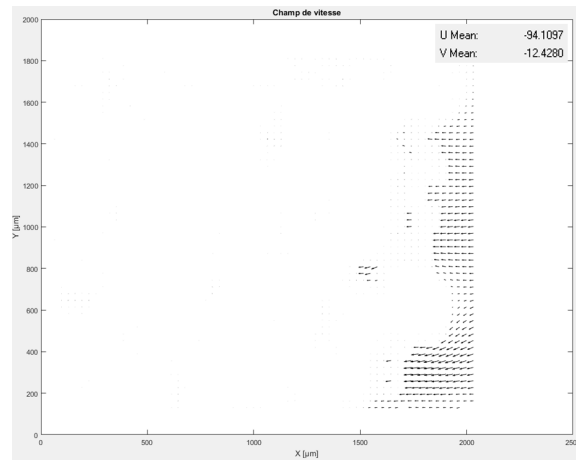
(b) Image médiane de l'ensemble des images



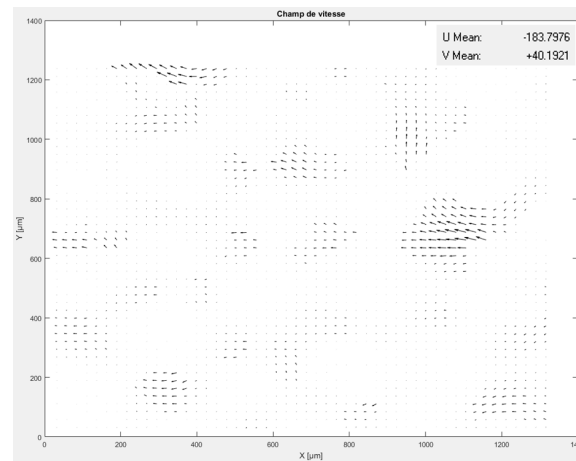
(c) Image fluorescente après soustraction de l'image médiane sans recalibration préalable

(d) Image fluorescente après division par l'image médiane avec recalibration préalable et contraste augmenté

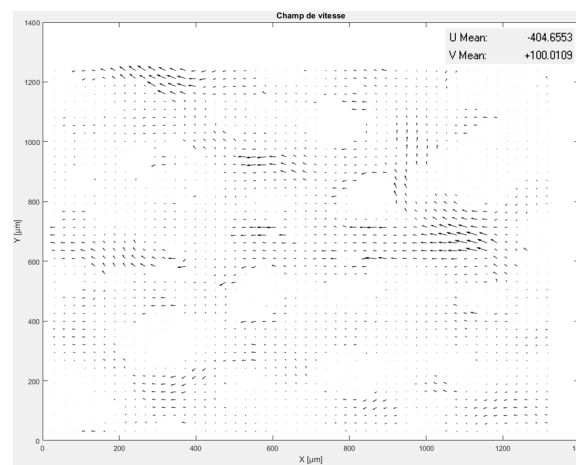
FIGURE 5.31 – Image fluorescente des particules de traçage et traitements appliqués.



(a) Champ de vitesse sur les images acquises sans traitement.



(b) Champ de vitesse après recalibration et application du filtre médian



(c) Champ de vitesse après recalibration, application du filtre médian et augmentation du contraste

FIGURE 5.32 – Champ de vitesse au niveau de l'empilement de la Figure 5.29 sans et avec traitement des images (la valeur moyenne est affichée).

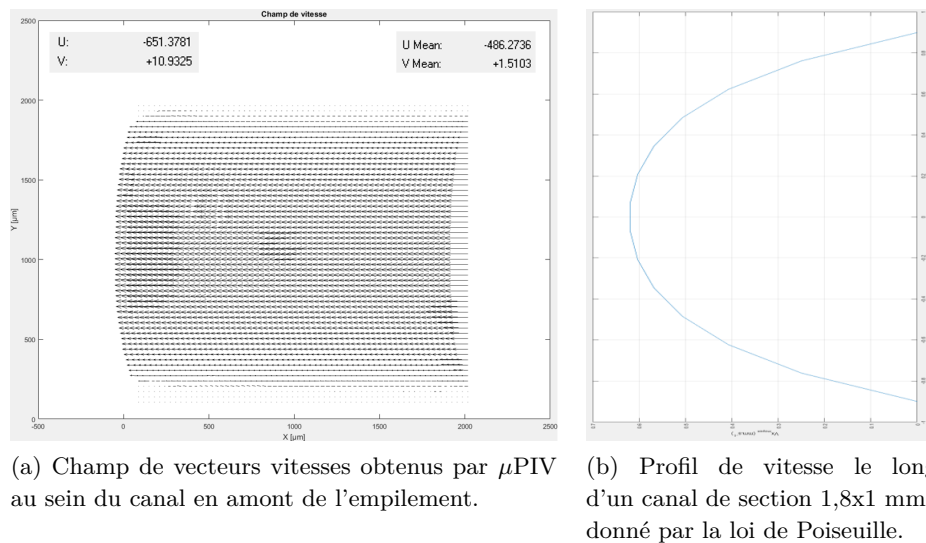


FIGURE 5.33 – Comparaison du champ de vitesse mesuré par μ PIV avec un écoulement de Poiseuille au sein du canal à section rectangulaire en amont de l'empilement.

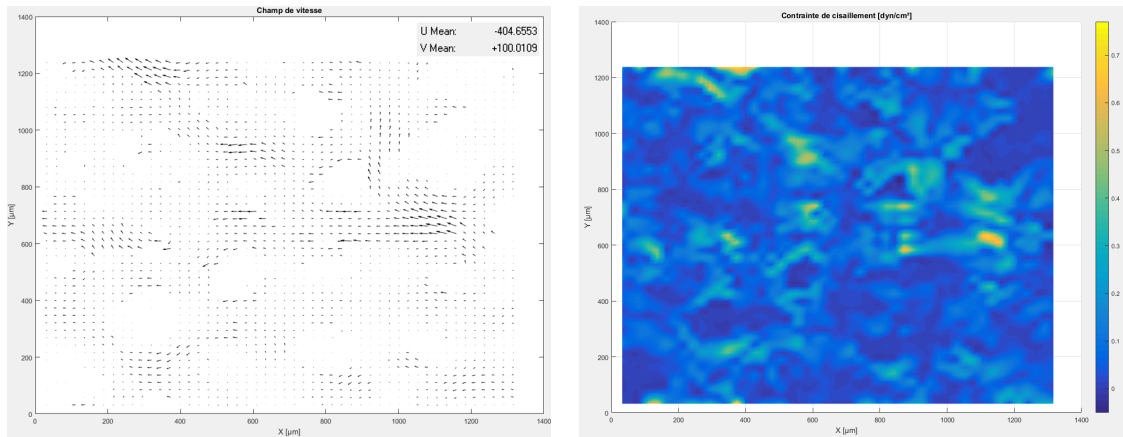
Le champ de vitesse normalisé obtenu au centre de l'empilement de la Figure 5.29 est visible Figure 5.32c. La valeur moyenne de la norme des vecteurs vitesses est mesurée à $506 \mu\text{m/s}$. Cette valeur est faible par rapport à la valeur vitesse attendue de :

$$u = \frac{u_0}{\epsilon} = \frac{463}{0.39} = 1187 \mu\text{m/s}$$

Néanmoins lorsqu'on étudie la distribution de la norme des vecteurs vitesses au sein de l'empilement, la courbe indique la présence de plusieurs vecteurs vitesses supérieurs à $1000 \mu\text{m/s}$ (Figure 5.35a).

Cependant, la distribution des vecteurs vitesses normalisée correspond aux courbes obtenues dans la littérature. La distribution de la vitesse longitudinale normalisée (Figure 5.35b) montre des vecteurs vitesses compris entre 0 et 4 fois la valeur moyenne avec certains vecteurs ponctuels atteignant jusqu'à 9 fois la valeur moyenne. Cela s'explique par la dispersion des tailles de pores. Pour un débit donné, plus les pores sont petits, plus la vitesse sera élevée. La distribution de la vitesse transverse normalisée est légèrement différente (Figure 5.35c). La distribution est plus large que celles de la littérature, avec des vitesses transverses atteignant jusqu'à 5 fois la valeur moyenne de la vitesse transverse. Dans la littérature, la distribution obtenue pour un empilement de sphères incompressibles est plutôt comprise entre -3 et 3. De plus, le pic de distribution est un peu décalé de la valeur 0 pour être centré sur $100 \mu\text{m/s}$, ce qui traduit le fait que le champ moyen des vitesses sur l'image ne se déplace pas exactement dans la direction de l'écoulement. Une bulle d'air est coincée en aval de la marche qui rompt la symétrie de l'écoulement.

Le champ de cisaillement est montré Figure 5.34b. Le cisaillement est nul au centre des sphères (couleur bleu foncée) et fort au niveau des parois (couleur verte-jaune). La



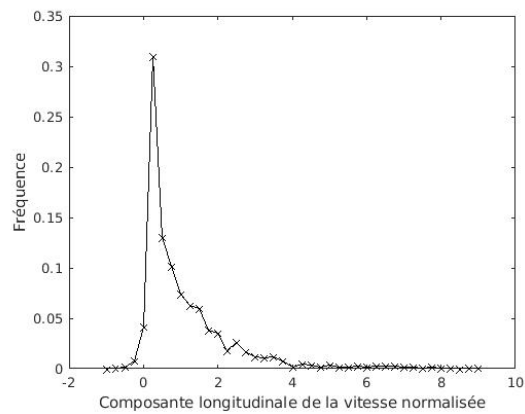
(a) Champ des vecteurs vitesses normalisés.
(Valeur de vitesse en $\mu\text{m/s}$)

(b) Champ des contraintes de cisaillement en dyn/cm^2 .
(Bleu foncé = 0 dyn/cm^2 - Jaune = 0.8 dyn/cm^2)

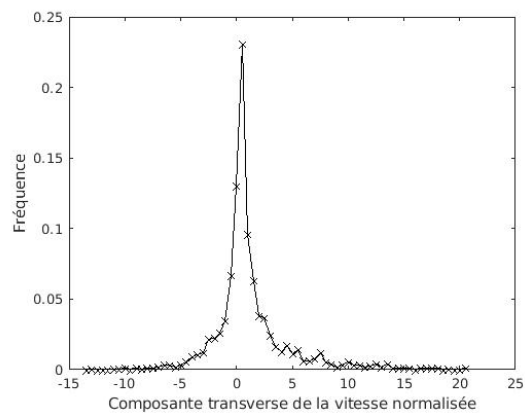
FIGURE 5.34 – Champ des vitesses et de la contrainte de cisaillement au sein de l'empilement aléatoire de microsphères perfusé avec un débit de $50 \mu\text{L}/\text{min}$.

valeur du cisaillement atteint des valeurs de 0.8 dyn/cm^2 au niveau de certaines parois. La courbe de distribution des contraintes de cisaillement est établie sur les cisaillements du champ entier, pas seulement ceux au niveau des parois où il est le plus important. Cela explique la valeur moyenne du cisaillement relativement faible de 0.0887 dyn/cm^2 . Néanmoins, la distribution révèle de nombreux cisaillements supérieurs à 0.1 dyn/cm^2 et atteignant jusqu'à 0.8 dyn/cm^2 (Figures 5.34b & 5.35c). L'équation 5.17 établie à partir du modèle de Carman prédisait un cisaillement moyen au niveau des parois de $0,39 \text{ dyn/cm}^2$. Ce modèle néglige la tortuosité et les effets de parois très présents dans notre système. Cependant, il fournit un ordre de grandeur proche des cisaillements obtenus dans notre système. Les mesures du champ de vitesses dans l'empilement valident les hypothèses et le modèle théorique que nous utilisons pour déterminer le cisaillement dans un empilement aléatoire en fonction du débit imposé.

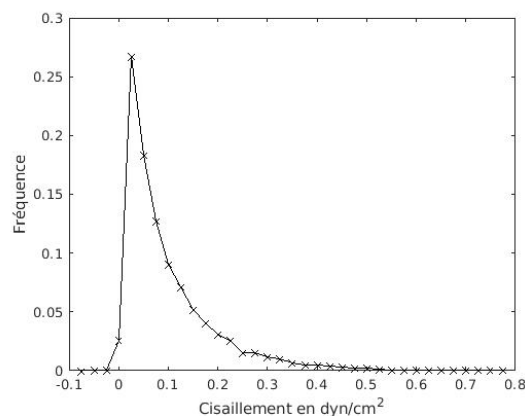
Ainsi, si nous souhaitons imposer une force de cisaillement de l'ordre de 1 à 10 dyn/cm^2 à la surface des parois où seront positionnées les cellules endothéliales, il faudra imposer un débit 10 fois plus important, de l'ordre de $500 \mu\text{L}/\text{min}$. Or, pour un tel débit, la pression imposée dans le canal déforme fortement les microsphères qui traversent le filtre mécanique. Afin de résoudre ce problème, nous formons par la suite des microsphères plus larges de l'ordre de $350 \mu\text{m}$ et modifions la composition des microsphères pour augmenter leur rigidité et réduire leur déformabilité. Comme l'augmentation du diamètre des sphères empilées augmente la dimension des pores, une autre solution devra être trouvée afin de pouvoir empiler des microsphères d'environ $200 - 300 \mu\text{m}$ de diamètre dans la chambre microfluidique ne traversant pas le filtre mécanique pour des débits importants. L'efficacité du filtre devra être améliorée.



(a) Distribution du champ de vitesse longitudinale normalisée par rapport à la vitesse longitudinale moyenne.



(b) Distribution du champ de vitesse transverse normalisée par rapport à la vitesse transverse moyenne.



(c) Distribution des contraintes de cisaillement.

FIGURE 5.35 – Distribution de vitesses et des cisaillements au sein d'un empilement de sphères de diamètre $293\mu\text{m} \pm 14.4\mu\text{m}$ perfusé à un débit de $50\mu\text{L}/\text{min}$.

5.4 Conclusion

Le but de ce chapitre est de caractériser la taille des pores au sein du milieu poreux formé par l'empilement de sphères ainsi que l'écoulement au travers d'une telle structure afin d'estimer le cisaillement. La structure développée par un empilement de sphères est complexe. La géométrie des pores est variable et dépend de l'agencement des sphères. La géométrie du milieu est alors caractérisée dans son ensemble à l'aide de grandeurs globales. La porosité est un paramètre important du milieu poreux. Elle détermine le pourcentage de vide au sein de la structure. La porosité dépend de l'agencement des sphères formant l'empilement. Pour un empilement aléatoire de sphères indéformables, la valeur de la porosité est comprise entre 0.36 et 0.48. Cependant, nous avons vu que des porosités plus faibles peuvent être atteintes pour des empilements de sphères déformables, où la structure de l'empilement hexagonal compact peut être formée.

La dimension des pores, correspondant à la dimension des futurs capillaires, dépend de la taille des microbilles empilées. Le diamètre des pores est caractérisé par le diamètre hydraulique du réseau de tubes cylindriques équivalent au modèle d'empilement de sphères, selon le modèle de Kozeny-Carman. Ainsi, on peut moduler la taille des pores à la dimension des capillaires sanguins. Dans ces conditions, en considérant que nous formons un empilement aléatoire compact de sphères lisses indéformables et totalement sphérique ($\epsilon = 0.36$), des microsphères de $80 \mu\text{m}$ de diamètre doivent être produites afin de former des porosités de diamètre hydraulique $30 \mu\text{m}$. Or ce modèle ne prend pas en compte la prolifération des cellules endothéliales au sein de la structure et les microsphères de biopolymères sont en réalité des ellipsoïdes déformables. En prenant en compte ces critères, nous verrons dans le prochain chapitre qu'il est plus intéressant de développer un empilement à partir de microsphères d'environ $300 \mu\text{m}$ de diamètre formant des dimensions théoriques de pores de $110 \mu\text{m}$ dans le cas d'un empilement aléatoire compact et de $70 \mu\text{m}$ dans le cas d'un empilement hexagonal compact.

Les équations de mécanique des fluides ne pouvant être résolues facilement au sein d'une telle structure, des modèles sont utilisés afin d'estimer les écoulements analytiquement ou avec des méthodes numériques lourdes. Dans le cas d'un écoulement laminaire, le modèle de Kozeny-Carman idéalise le milieu par un ensemble de canaux parallèles de section constante. La dimension moyenne des pores est caractérisée par le diamètre hydraulique. Ce modèle combiné à la loi d'Hagen-Poiseuille d'écoulement au sein d'un canal cylindrique permet d'estimer une grandeur de cisaillement moyenne au niveau des parois.

Les spécificités locales de l'écoulement au sein de la géométrie aléatoire en milieu confiné sont étudiées à l'aide de méthodes de calculs numériques et des mesures expérimentales. Ces études mettent en avant l'impact des parois sur la porosité et l'écoulement. Elles permettent également de déterminer l'amplitude des variations de l'écoulement au sein de la structure aléatoire. Une mesure expérimentale par μPIV a été menée au sein de notre structure et a permis de valider l'ordre de grandeur du cisaillement au niveau des parois fourni par le modèle de Kozeny-Carman. Ce modèle pourra ainsi être appliqué afin d'imposer un cisaillement de 1 à 10 dynes/cm^2 à la surface des sphères qui sera par la

suite recouverte de cellules endothéliales.

Chapitre 6

Formation et caractérisation du réseau vascularisé

Afin de former notre réseau poreux endothélialisé, des sphères de biopolymères, de diamètre compris entre 300 et 400 μm , sont produites et une couche de cellules endothéliales est développée à la surface. Une fois la couche endothéliale formée, les microsphères sont empilées dans une chambre et l'espace poreux est perfusé par du milieu de culture de sorte à influencer l'orientation des cellules endothéliales au sein de l'espace interstitiel dans la direction des lignes de courant. Après plusieurs jours de culture, la reproduction du réseau microvasculaire est analysée et caractérisée.

6.1 Recouvrement des microsphères de cellules endothéliales

Les cellules endothéliales sont sensibles au matériau sur lequel elles se développent. Le biomatériau le plus adéquat pour l'accroche des cellules endothéliales, compatible avec la formation de microsphères via notre dispositif de création de capsules, doit être déterminé. Pour cela, nous vérifions dans un premier temps la bonne accroche des cellules endothéliales par déposition sur des biopolymères gélifiés de différentes compositions. Une fois la composition la plus optimale identifiée, des microsphères sont produites à partir de ce biomatériau. L'accroche des cellules endothéliales est ensuite réalisée sur les microsphères.

6.1.1 Affinité des cellules endothéliales avec le biopolymère

6.1.1.1 Etude de la littérature

Benning *et al.* ont étudié les propriétés de différents hydrogels afin de déterminer les plus efficaces pour la bio-impression de cellules endothéliales [383]. Dans cette étude, les propriétés physiques (tension de surface, viscosité, viscoélasticité, dilatation et dégradation) ainsi que les propriétés de biocompatibilité (viabilité et prolifération des cellules endothéliales) de plusieurs hydrogels commerciaux ont été comparées. Les biopolymères testés ont été le Matrigel, la fibrine, le collagène, la gélatine, l'agarose, le Pluronic F127,

l'alginate et un mélange alginate-gélatine. Des tests de viabilité spécifique ont été réalisés par déposition des cellules sur des gels de ces biopolymères et mesure de la viabilité avec un test Live/Dead classique. Il ressort de leur étude que le Matrigel, la fibrine, le collagène et la gélatine présentent chacune une excellente viabilité cellulaire et que le pluronic F-127 et l'agarose ne supportent pas l'accroche des cellules endothéliales (ECs). Un faible attachement est également observé pour le gel formé à partir du mélange d'alginate-gélatine.

Ces résultats nous confortent dans l'idée de développer des sphères de collagène. Cependant, la combinaison du collagène et de l'alginate est nécessaire, dans notre cas, car il est essentiel à la formation des microsphères. Le Matrigel, la fibrine, le collagène et la gélatine sont toutes des solutions solubles en milieu aqueux, possédant une gélification lente et dont le biopolymère gélifié présente une faible tenue mécanique. Ainsi, des gouttes formées à partir de ces biopolymères se dissolvent dans le bain de récupération avant d'avoir le temps de gélifier. L'utilisation de tensioactifs peut permettre d'empêcher la dissolution et la coalescence des gouttes dans le bain aqueux de récupération, mais la nature du tensioactif ainsi que la concentration à utiliser sont deux paramètres complexes à déterminer pour un couple de solutions : hydrogel / bain de gélification. De plus, les tensioactifs modifient la surface des microgouttes ce qui peut détériorer les contacts entre cellules endothéliales et biopolymère à la surface des sphères. Enfin, des effets cytotoxiques des tensioactifs sur les cellules ont été observés [384, 385, 386, 387]. Pour ces raisons, nous souhaitons éviter leur utilisation.

La combinaison du collagène et de l'alginate afin de produire des microsphères contenant du collagène est une stratégie qui a déjà été utilisée par plusieurs équipes [388, 338, 315, 389, 390]. Wu *et al.* et l'équipe de Yoshida *et al.* ont également utilisé un mélange d'alginate et collagène suivi d'un recouvrement des capsules avec de la L-lysine afin de permettre la dégelification dans un second temps de l'alginate contenue dans la microsphère [391, 392]. La plupart de ces équipes utilise ce biopolymère afin d'encapsuler des cellules mais ne développe pas de cellules à la surface de celles-ci. Matsunaga *et al.* montrent un recouvrement homogène des microsphères de collagène avec différents types de cellules, dont des cellules endothéliales [258]. Mahou *et al.* développent une couche de cellules endothéliales à la surface de microsphères d'alginate-collagène, en effectuant un traitement de surface améliorant l'accroche et le développement des cellules [339]. Il apparaît donc possible de développer une couche d'ECs à la surface de notre mélange, mais l'affinité entre les ECs et le biopolymère doit être vérifiée.

6.1.1.2 Culture des cellules endothéliales sur gel plan

Afin de déterminer le biopolymère préférentiel pour les cellules, on cultive les cellules sur des gels formés par ces biopolymères et on étudie leur évolution. Plusieurs gels de différentes natures et différentes concentrations sont formés dans des plaques de culture 12 puits. Les hydrogels suivant sont testés :

- La gélatine à 0.01% (déposition d'une fine couche recouvrant le fond du puits) :

cette condition sert de témoin positif d'adhérence et de développement des cellules endothéliales

- Le collagène commercial de Corning à 3 mg/mL
- Le collagène commercial de Corning à 6 mg/mL
- Le collagène commercial de Advanced BioMatrix : EzPureCol^o à 5 mg/mL
- L'alginate SLM à 2%
- L'alginate SLG à 2%
- Un mélange alginate SLM à 2% et collagène à 3 mg/mL
- Un mélange alginate SLM à 1.6% et collagène EzPureCol^o à 3 mg/mL (*SLM1.6 – EzPureCol3*)

200.000 cellules endothéliales sont déposées à la surface de ces gels, et l'évolution de la culture est suivie par microscopie.

Après une nuit de culture sur ces gels, on constate que les cellules adhèrent aux gels de collagène (Figure 6.1b, c & d). Cela s'observe par leur aspect étalé. A l'inverse, les cellules n'adhèrent pas aux gels d'alginate (Figure 6.1e). Les cellules ne s'étalent pas et forment des agglomérats entre elles. La même observation est effectuée pour le mélange d'alginate SLM1.6-EzPureCol3, malgré la présence du collagène (Figure 6.1g). Néanmoins, les cellules montrent une accroche sur les gels SLM1-Col3 et SLM2-Col3 (Figure 6.1f). Les cellules mettent plus de temps à s'étaler et proliférer sur ces gels que sur ceux de collagène pur ou sur la couche de gélatine. Les cellules se développent au bout d'un jour. Il semble que les cellules ont besoin d'un temps d'adaptation au gel.

Comme la gélification de l'alginate permet une solidification instantanée des capsules lors de leur chute dans le bain aqueux de calcium et que le collagène présente des sites d'accroches pour les cellules endothéliales, nous décidons d'utiliser un mélange de ces deux hydrogels en tant que biopolymère pour nos capsules. La concentration de chacun entrant dans la composition finale des microsphères sera déterminée par le taux et la vitesse de recouvrement des sphères.

6.1.2 Recouvrement des capsules

L'accroche et le développement des cellules endothéliales sur des gels plans conçus à partir d'un mélange d'alginate et de collagène ont été vérifiés. L'étape suivante consiste à produire des microsphères à partir de ce mélange de biopolymère et développer une couche de cellules endothéliales enveloppant la capsule.

6.1.2.1 Proportion du mélange d'alginate et collagène

Dans un premier temps, nous cherchons à déterminer la concentration de collagène et d'alginate à utiliser pour produire les capsules. Nous souhaitons utiliser la concentration en collagène la plus forte afin de fournir un maximum de sites d'accroches aux cellules.

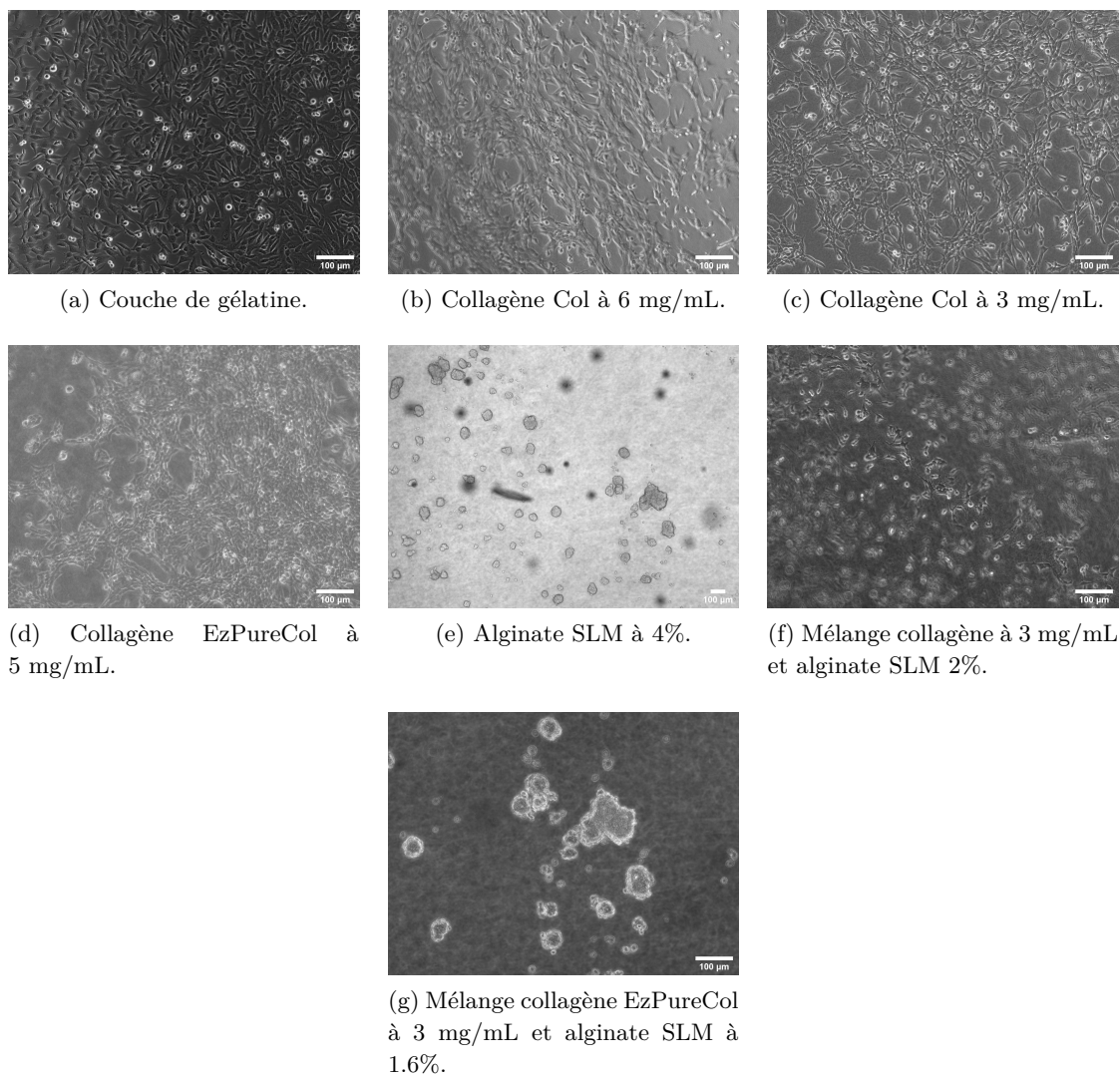


FIGURE 6.1 – Culture des cellules endothéliales sur différents biopolymères.

En se basant sur les compositions utilisées dans la littérature, nous testons l'accroche des cellules endothéliales sur trois lots de capsules de composition différentes : SLM2-Col3, SLM1-Col3 et SLM1-Col1.5. L'efficacité du recouvrement des cellules endothéliales est étudiée sur chacun de ces lots de capsules. Pour chaque lot, l'accroche est réalisée dans les mêmes conditions : environ 800 capsules et 500.000 cellules sont mises en contact dans 2 mL de milieu de culture au sein d'un tube Falcon 5 mL. Le milieu est mis en suspension par agitation manuelle du tube toutes les 20 minutes durant 4 heures, permettant aux cellules d'adhérer aux capsules. Au bout de 4 heures, l'ensemble capsules et cellules est transféré en plaque de culture et cultivé plusieurs jours le temps que les cellules recouvrent les capsules.

On peut voir Figure 6.2 le développement des cellules sur les différentes microsphères après 3 et 6 jours de culture, pour chaque composition. Plusieurs conclusions peuvent être tirées de ces images. Un premier aspect à noter est que peu de cellules ont adhéré aux capsules, quelque soit la composition : le taux de recouvrement des capsules est globalement faible et la majorité des cellules n'a adhéré à aucune capsule et s'est développée sur le fond des flasques (Figure 6.2a, c & e). Néanmoins, on observe que les cellules adhèrent préférentiellement aux capsules de SLM2-Col3 : de nombreuses capsules de SLM1-Col1.5 et SLM1-Col3 ne contiennent aucune cellule endothéliale à leur surface alors que la quasi-totalité des capsules de SLM2-Col3 possède de nombreuses cellules endothéliales accrochées au bout de 6 jours de culture (Figure 6.2b, d & f). Cette expérience a été reproduite plusieurs fois et à chaque fois l'accroche sur les capsules de SLM1-Col3 et SLM1-Col1.5 était limitée : le mélange de biopolymère SLM2-Col3 semble être le plus adapté. Nous supposons que cette amélioration est due à la rigidité plus importante des capsules composées de SLM à 2%. Enfin, on observe clairement, pour les capsules sur lesquelles des cellules ont adhéré, un développement des cellules endothéliales à la surface de ces capsules. Pour chaque mélange de biopolymère, le taux de recouvrement a augmenté entre 3 jours et 6 jours de culture. Le taux d'accroche n'est cependant pas satisfaisant sur cette expérience, car les cellules commencent à recouvrir la totalité de la surface de la sphère seulement au bout de 6 jours.

6.1.2.2 Paramètres influençant le recouvrement des cellules endothéliales

Le mélange SLM2-Col3 est le mélange choisi afin de produire nos capsules, mais le protocole nécessite d'être amélioré. Plusieurs facteurs, que nous ne contrôlons pas toujours précisément, semblent influencer l'efficacité de l'adhésion des cellules endothéliales à la surface des microsphères. Bien que nous ne pouvons pas affirmer précisément l'influence de chaque facteur, nous présentons les paramètres influençant l'expérience et tentons d'apporter des explications, dans le but d'améliorer le rendement et la reproductibilité des expériences pratiquées.

Il y a de la variabilité dans les résultats d'accroche cellulaire : certaines expériences reproduites à l'identique ont vu un taux d'accroche faible voire nul alors que la même

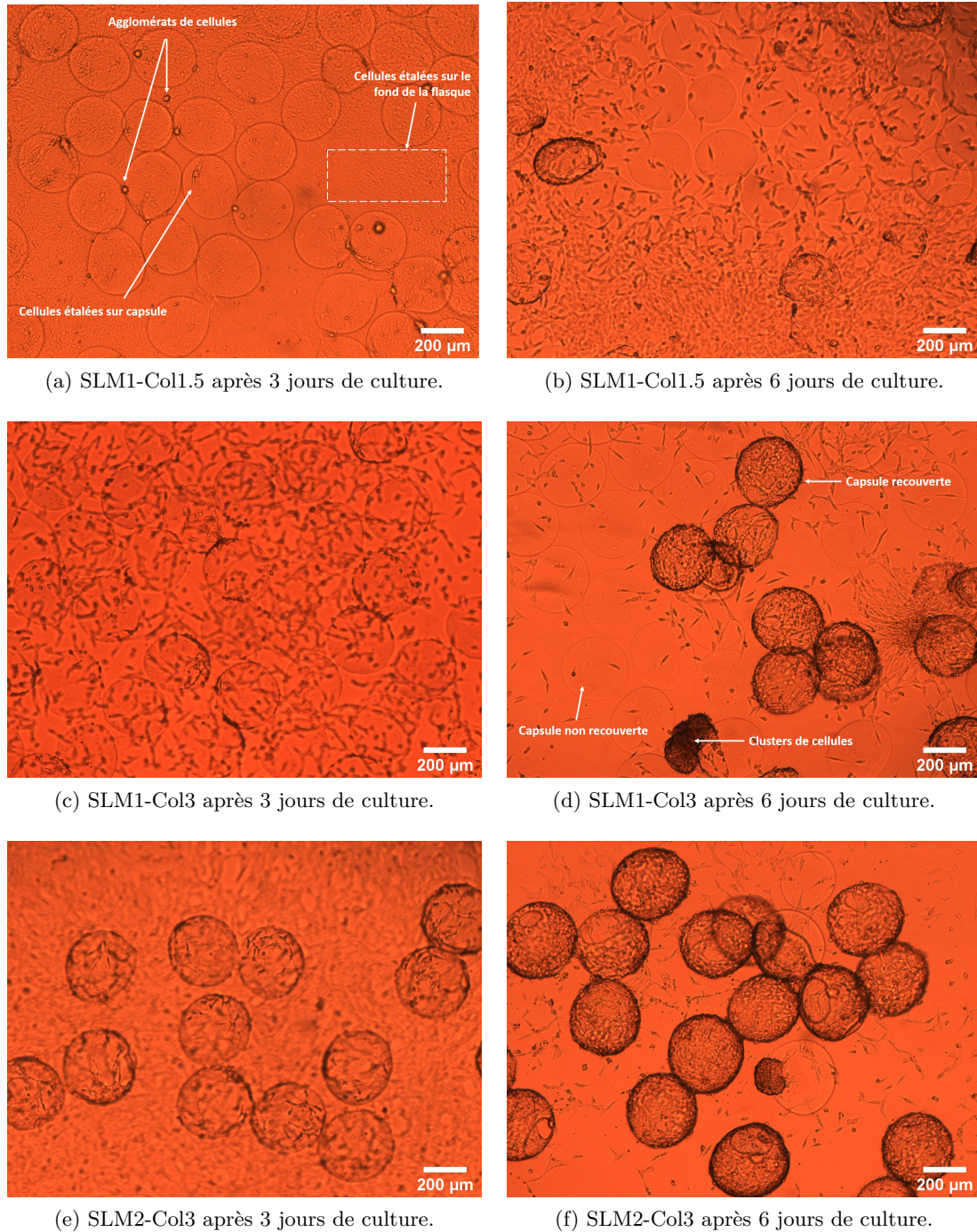


FIGURE 6.2 – Accroche et culture des cellules endothéliales sur des microsphères composées de différents mélanges de biopolymères.

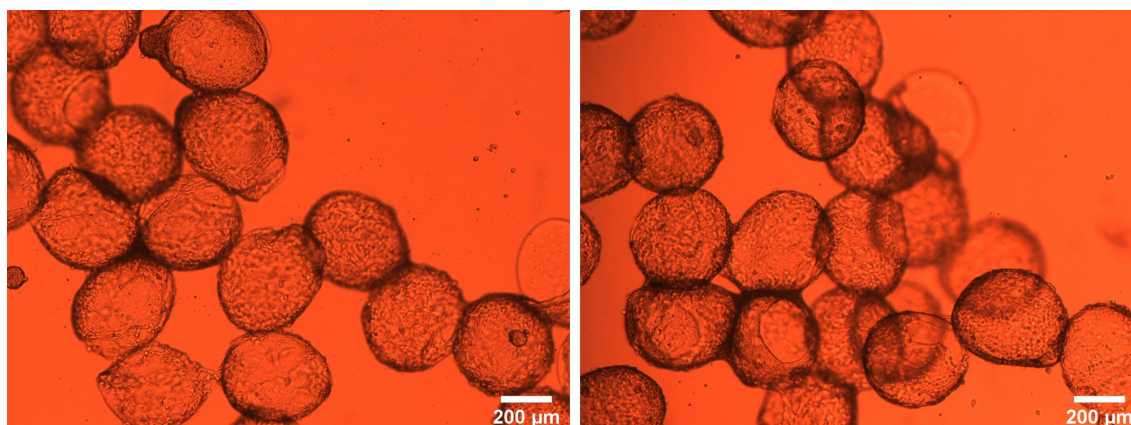
expérience réalisée dans les mêmes conditions et avec les mêmes solutions avait fonctionné auparavant. Par exemple, on peut observer des résultats très différents entre deux expériences réalisées dans les mêmes conditions sur la Figure 6.3. Sur l'expérience de la Figure 6.3a, la quasi-totalité des microsphères présente de nombreuses cellules à leur surface et un recouvrement important alors que pour l'expérience réalisée un mois plus tard, présentée Figure 6.3b, quelques microsphères sont recouvertes mais la majorité ne présente aucune cellule à leur surface. Au contraire, des agglomérats importants de cellules sont présents, signe que les cellules endothéliales préfèrent se regrouper entre elles plutôt que de s'étaler à la surface des capsules. La solution mère de collagène était la même. Nous pensons que le vieillissement des solutions, notamment de la solution de collagène, pourrait avoir une influence sur la diminution de l'accroche des cellules endothéliales à la surface des capsules. En effet, lorsque les expériences de recouvrement échouaient à plusieurs reprises, un changement de solutions a souvent permis de rétablir l'efficacité des expériences. De plus, il a été observé un comportement différent des cellules endothéliales au cours des expériences. Nous ne savons pas si cela était dû au vieillissement des cellules endothéliales après plusieurs passages ou à un vieillissement des milieux de culture provoquant une prolifération réduite des cellules endothéliales, mais il a été observé une variation de la vitesse de prolifération des cellules endothéliales au cours des expériences. Ces points mettent en avant la variabilité des expériences, bien que reproduites à l'identique, ainsi que la sensibilité des cellules endothéliales.

Étonnamment, nous avons également remarqué que l'efficacité de l'accroche était réduite lorsque les microsphères étaient produites quelques jours avant la mise en contact avec les cellules (par rapport à une production précédant d'une heure la mise en contact avec les cellules). Sur la Figure 6.4, on peut voir le développement des cellules endothéliales à la surface de microsphères de SLM2-Col3 produites de la même manière et avec les mêmes solutions, excepté le fait qu'un des lots a été produit la veille de l'accroche, chauffé à 37°C pendant plusieurs heures, puis conservé la nuit à 4°C quand le second lot a été produit juste avant la mise en contact avec les cellules. On constate que de nombreuses microsphères produites la veille ne possèdent aucune cellule sur leur surface alors que l'accroche réalisée à la suite de la production des microsphères a été efficace. Une raison potentielle pourrait être liée à la contractibilité du collagène qui serait uniquement présent dans le coeur de la capsule et non plus à la surface des microsphères.

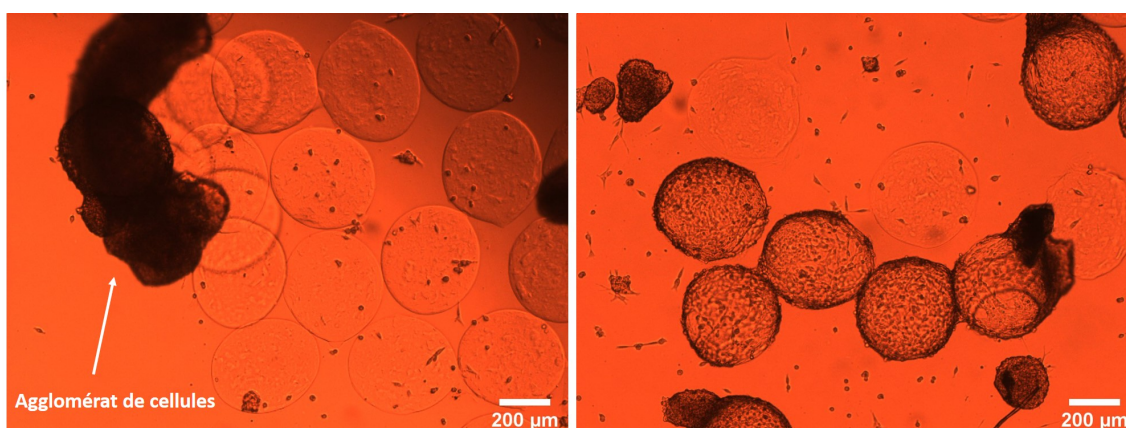
6.1.2.3 Ajustement du protocole d'accroche

Déposition d'une fine couche de collagène à la surface des microsphères

Afin d'améliorer l'efficacité de l'accroche, nous avons décidé d'effectuer une étape supplémentaire de recouvrement des parois à la conception des microsphères, comme cela est suggéré dans la publication de Mahou *et al.* [339]. Mahou et son équipe produisent des microsphères à partir d'un mélange d'alginate et collagène, et traitent les microsphères

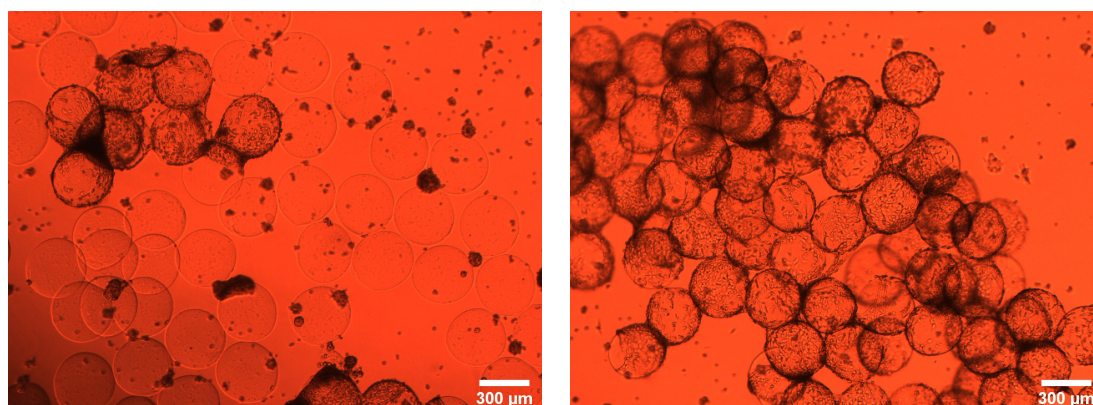


(a) Accroche des cellules sur les microsphères réalisée le 11 Mars 2019.



(b) Accroche des cellules sur les microsphères réalisée le 09 Avril 2019

FIGURE 6.3 – Variation de l'efficacité du recouvrement des microsphères de SLM2-Col3 par les cellules endothéliales à J3 après accroche pour des expériences reproduites à l'identique.



(a) Microsphères produites un jour avant la mise en contact avec les cellules.

(b) Microsphères produites juste avant la mise en contact avec les cellules.

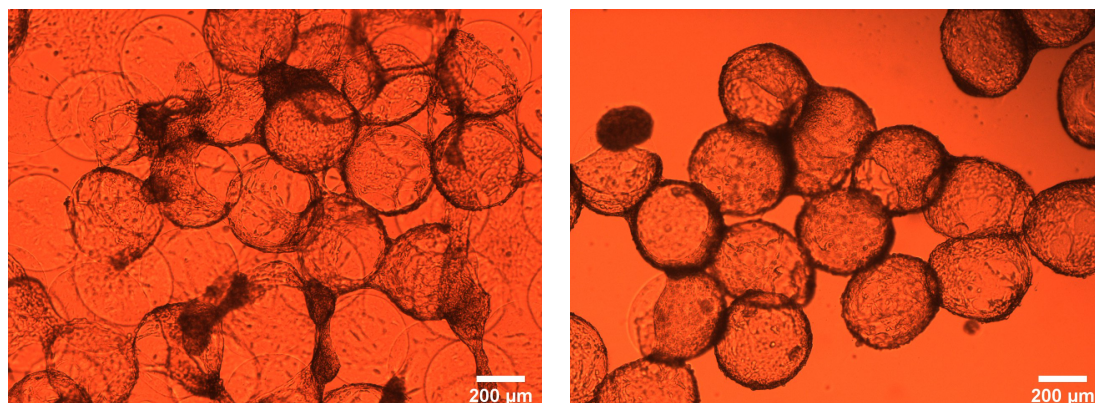
FIGURE 6.4 – Effet de la préparation des microsphères sur l'efficacité de l'accroche à J2.

dans un second temps en les plaçant dans une solution liquide de collagène contenant du citrate de sodium faiblement concentré. Selon leur étude, le citrate de sodium dégélifie l'alginate périphérique des capsules et la surface est recouverte de collagène. Ils montrent l'efficacité de ce traitement sur le recouvrement des microsphères par des cellules endothéliales HUVECs. Nous avons essayé de reproduire le protocole de cette publication mais, dans notre cas, le transfert des microsphères dans un bain aqueux de citrate de sodium provoquait la dégelification des capsules et leur dissolution, même pour des concentrations en citrate de sodium plus faibles que dans publication. Nous avons donc décidé de tester l'étape de recouvrement des microsphères par du collagène en s'abstenant de l'utilisation du citrate de sodium.

Lors de la formation des gouttes par force de centrifugeuse, le bain de calcium de récupération des microsphères est pré-refroidi dans un bac à glace, puis les microsphères sont transférées directement après production dans une solution à 4°C contenant du sérum physiologique et 0.2 mg/mL de collagène neutralisé. Les microsphères sont laissées une heure dans cette solution, agitée régulièrement. Au bout d'une heure, les microsphères sont mises en contact avec les cellules dans du milieu de culture à 37°C.

Cette étape de recouvrement améliore considérablement l'accroche des cellules endothéliales à la surface des capsules. La Figure 6.5 montre un recouvrement 2 jours après accroche, pour des capsules issues d'un même lot, la moitié d'entre elles ayant été recouvertes de collagène. On observe un recouvrement inhomogène des capsules (Figure 6.5a) alors que toutes les capsules ayant subi un recouvrement de collagène possèdent un recouvrement régulier par les cellules endothéliales (Figure 6.5b). Cette expérience a été réalisée plusieurs fois, et le recouvrement avec du collagène montre une réelle amélioration de l'accroche des cellules endothéliales sur les microsphères.

L'implémentation d'une étape de recouvrement des microsphères d'une fine couche de collagène entraîne un problème qu'il faut prendre en considération. Le collagène se développe sous forme de fibrilles qui s'assemblent pour former des fibres de collagène. Lors de la gélification des microsphères composées de collagène, il est possible d'observer ces fibres provenant des microsphères lorsque leur taille est importante (Figure 6.6a). L'étape additionnelle de recouvrement des capsules rajoute du collagène dans le milieu contenant les capsules. Lors de l'étape de déposition du collagène, les microsphères sont placées dans du sérum physiologique contenant du collagène neutralisé à 0.2 mg/mL. Au bout d'une heure et demi, ce milieu est évacué par pipetage et les microsphères sont mises en contact avec les cellules dans du milieu de culture et transférées dans un tube à fond rond. L'évacuation du milieu est difficile à réaliser expérimentalement car il faut prélever le maximum de milieu sans aspirer de microsphères. Ainsi, du collagène résiduel est généralement présent hors des microsphères. Lorsque il est présent en quantité trop importante, il arrive que des fibres de collagène, de grandes tailles à l'échelle des microsphères, se forment (Figure 6.6b). Les cellules endothéliales adhèrent à ces fibres de collagène (Figure 6.6c). Lorsque ces fibres sont présentes à la surface des microsphères, elles favorisent l'adhérence des cellules endothéliales à la surface. Cependant, lorsque de longues



(a) Microsphères SLM2-Col3 à J2 après accroche des HMECs.

(b) Microsphères SLM2-Col3 issues de la même production qu'en (a), recouvertes de collagène, à J2 après accroche des HMECs.

FIGURE 6.5 – Comparaison de l'impact du recouvrement au collagène sur l'accroche des HMECs sur les capsules.

fibres sont présentes dans le milieu, elles piègent de nombreuses cellules ne possédant pas de structure solide sur laquelle s'étaler et forment des agglomérats (Figure 6.6d). Lors de la culture des cellules suivant l'accroche, les microsphères ont tendance à se regrouper autour de ces agglomérats de cellules piégées dans les longues fibres et former des agglomérats de microsphères. Nous souhaitons éviter cette configuration car les cellules n'adoptent pas leur forme allongée et ne peuvent développer un endothélium dans cette configuration. De plus, les agglomérats de cellules semblent boucher les espaces inter-capsules. Afin d'éviter au maximum la formation de fibrilles de collagène hors capsule, il faut évacuer le maximum de solution suite à l'étape de déposition de collagène.

Développement de la couche endothéliale

En corrigeant les paramètres de l'expérience, il est possible de faire adhérer des cellules endothéliales à la surface des microsphères et de développer une couche homogène de cellules recouvrant les microsphères en 2-3 jours. On peut voir Figure 6.7 l'évolution des cellules endothéliales à la surface des microsphères permettant d'obtenir un recouvrement des capsules au bout de 3 jours. Le recouvrement est homogène sur l'ensemble des capsules. Il est intéressant d'observer que les microsphères se rapprochent les unes des autres lors de la culture. Les cellules adhèrent sur les parois et développent des points de fixation sur plusieurs microsphères provoquant un regroupement des microsphères et une adhérence les unes aux autres.

Sur la Figure 6.8 présentant une vue rapprochée de microsphères recouvertes, on observe l'homogénéité du recouvrement sur toute la surface des microsphères ainsi que les contacts cellulaires s'établissant entre les microsphères. Un contact direct se crée entre les microsphères via l'accroche des cellules endothéliales. Si l'on cultive les cellules trop long-

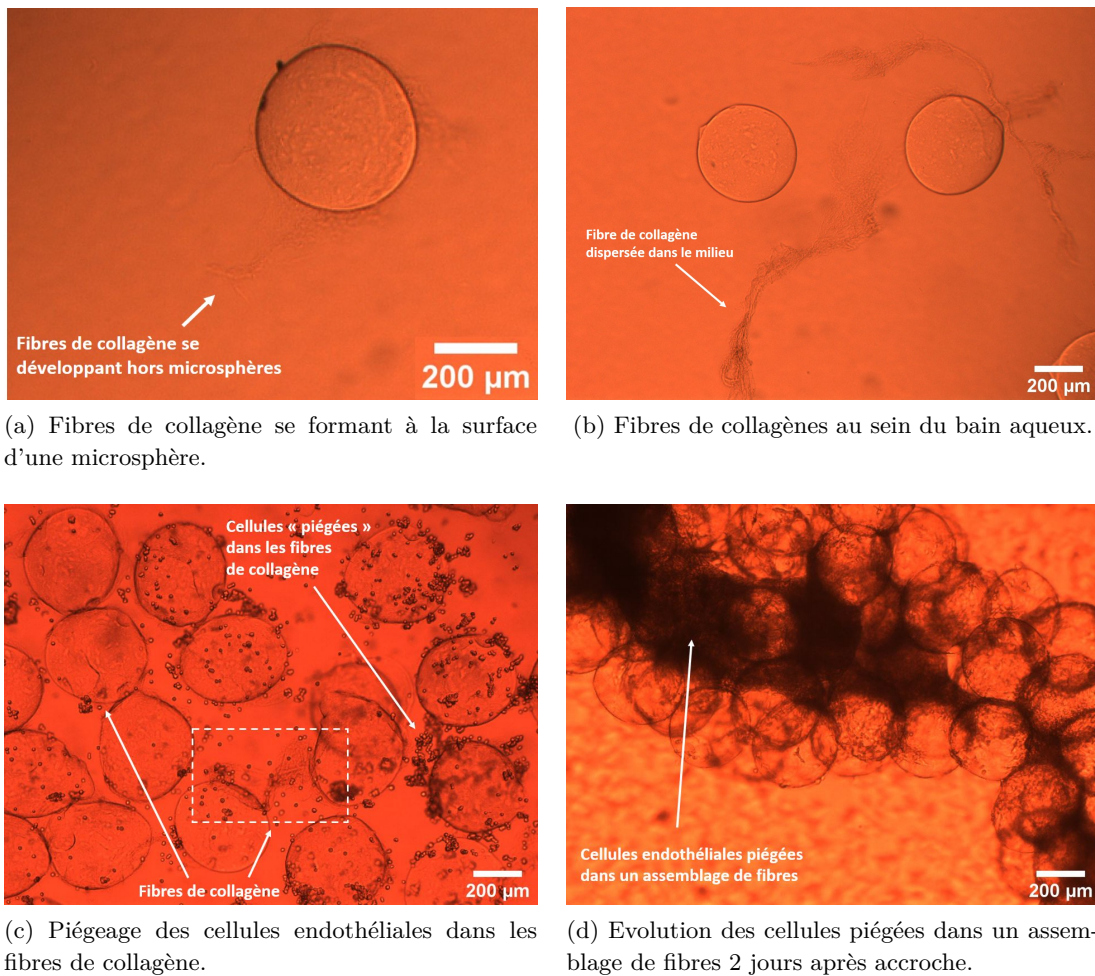


FIGURE 6.6 – Effet des fibres de collagène sur le recouvrement de cellules.

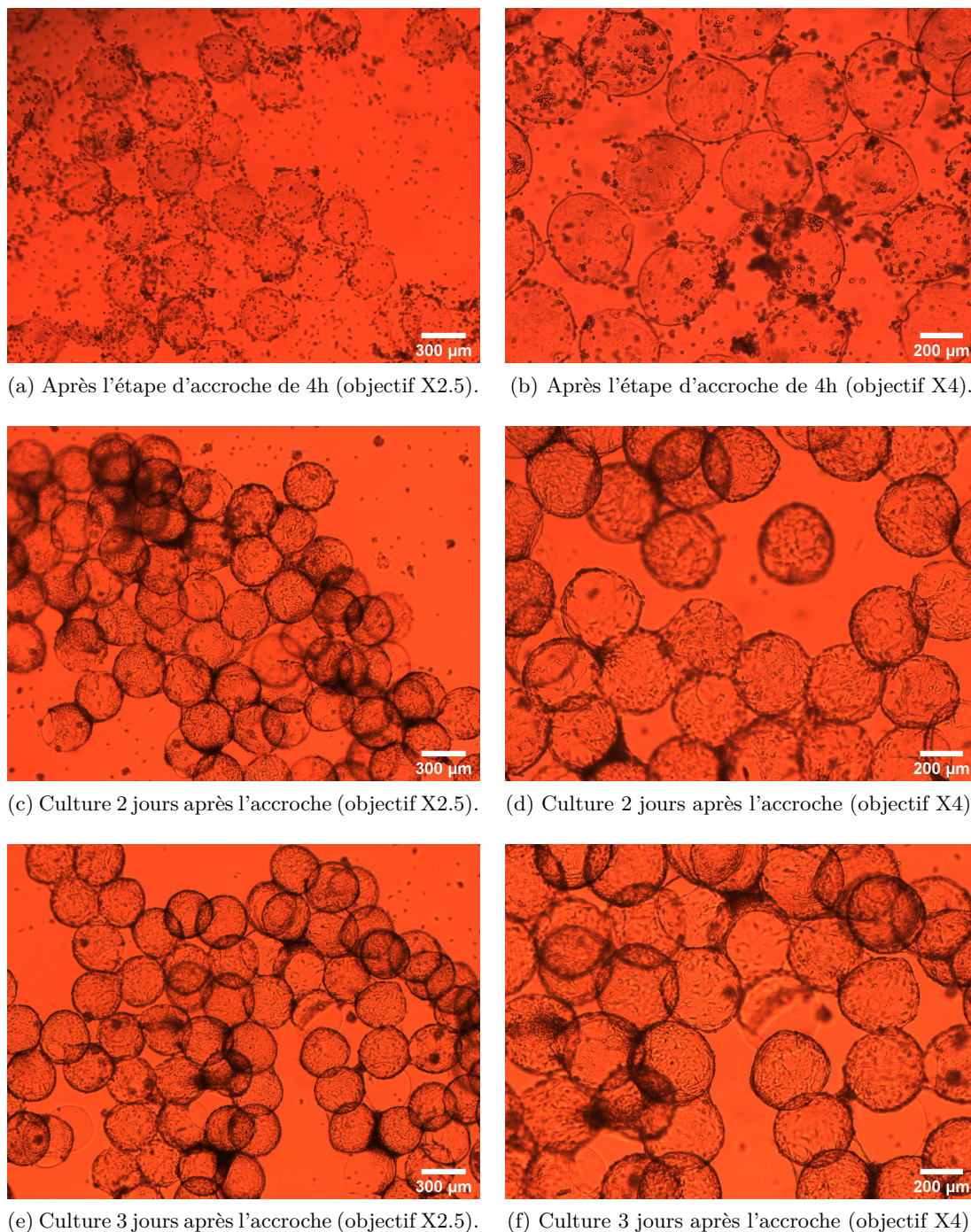


FIGURE 6.7 – Evolution de l'accroche et de la culture des cellules endothéliales sur des microsphères de SLM2-Col3 enveloppées d'une couche de collagène.

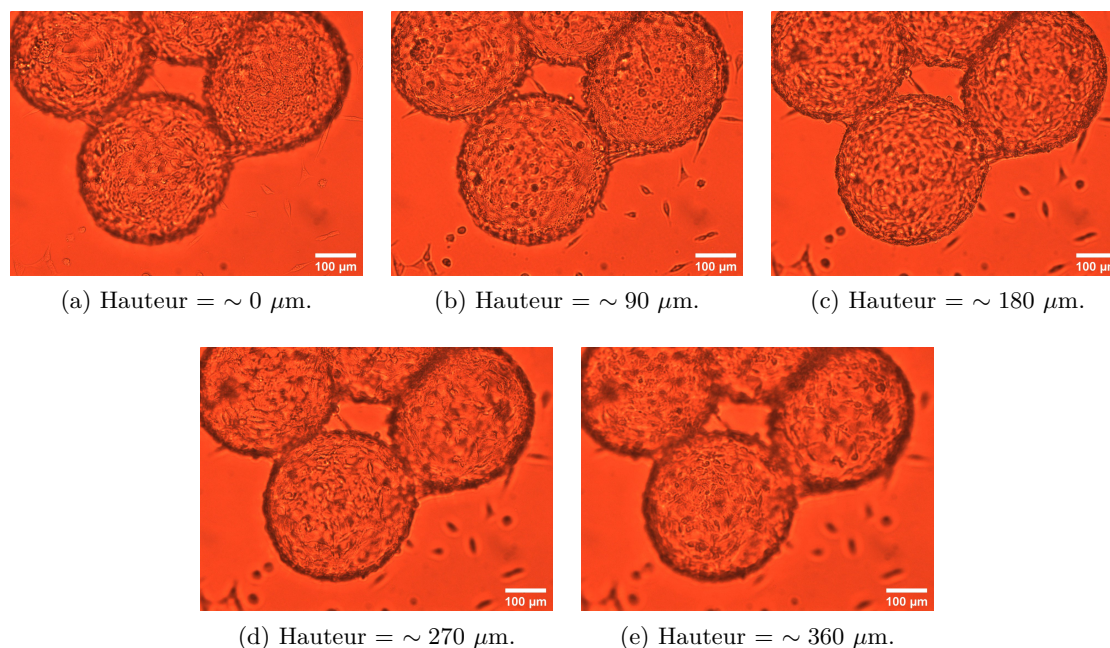


FIGURE 6.8 – Recouvrement de la surface des microsphères SLM2-Col3 par les cellules HMECs-GFP à 2 jours de culture.

temps avant leur injection dans la carte microfluidique, les microsphères s'agglomèrent et forment des liaisons entre elles via les cellules. L'agglomérat peut parfois être très important et contenir une cinquantaine de microsphères. De plus, la structure de l'empilement est différente entre un empilement de microsphères et un empilement d'agglomérats de microsphères. Dans le second cas, l'empilement obtenu est moins dense. Il est difficile de décider à quel moment injecter les microsphères : il faut attendre un recouvrement suffisant par les cellules endothéliales tout en évitant une agglomération des microsphères les unes aux autres et la formation de bouchons de cellules dans l'espace interstitiel entre les microsphères.

Concernant l'empilement de sphères recouvertes, il est intéressant d'observer un type de pores, formés par le rapprochement de 4 sphères dans le plan, que l'on pourrait rencontrer au sein de notre chambre de culture microfluidique (Figure 6.8).

Une viabilité des cellules endothéliales a été effectuée à 3 jours de culture sur la surface des microsphères. Les cellules vivantes sont marquées par du SytoTM13 colorant l'acide nucléique des cellules vivantes en vert, et les cellules mortes sont marquées par du iodure de propidium (IP) marquant les cellules mortes en rouge. Comme les cellules endothéliales HMECs-GFP sont fluorescentes de base dans le vert, il n'est pas possible d'effectuer une viabilité quantitative, mais les images offrent une indication de la proportion de cellules vivantes et mortes. Les tests de viabilité montrent un faible nombre de cellules mortes au bout de 3 jours et demi de culture (Figure 6.9).

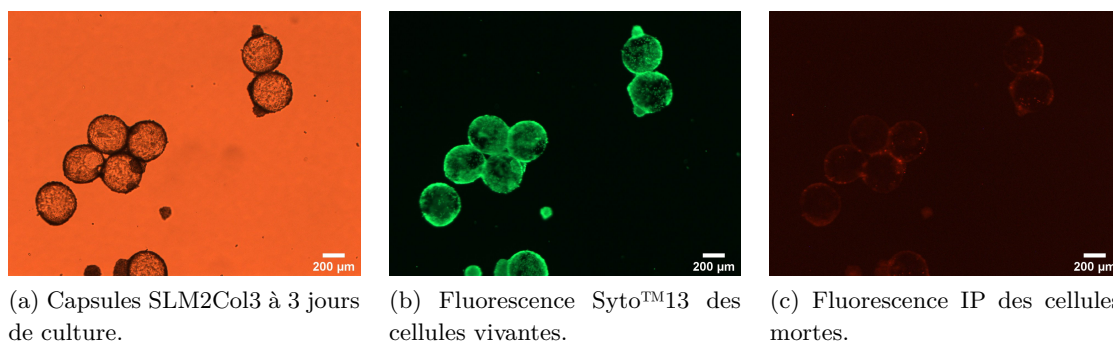


FIGURE 6.9 – Mesure de viabilité des cellules endothéliales à la surface des microsphères à 3 jours de culture.

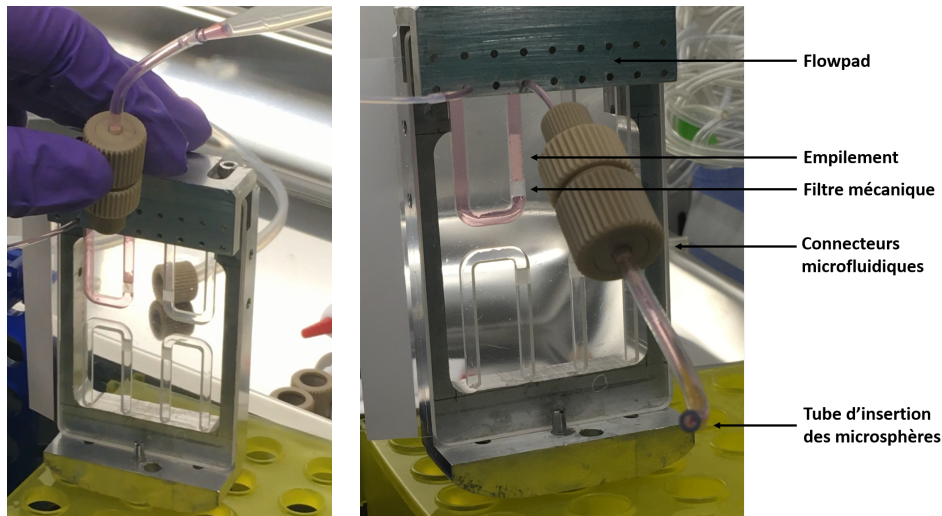
De nombreuses précautions sont à prendre en compte pour le développement d'une couche homogène de cellules endothéliales à la surface des capsules. Après optimisation des paramètres limitant l'accroche et le développement des cellules endothéliales, un protocole efficace et globalement assez reproductible a été établi. Ces microsphères sont destinées à être injectées dans une chambre microfluidique de culture afin de former un empilement de sphères. Il est difficile d'estimer à quel instant injecter les microsphères et imposer un cisaillement physiologique à la surface des microsphères. Il faut attendre un recouvrement suffisant des microsphères sans pour autant que les cellules se développent suffisamment et forment des agglomérats de microsphères. Après les nombreuses expériences réalisées, nous pensons que l'instant le plus favorable pour la formation de l'empilement de sphères endothélialisées est obtenu après 1 jour de culture après une accroche des cellules réalisées à une proportion de 800.000 cellules pour 800 microsphères.

6.2 Conception de l'empilement de sphères endothélialisées et perfusion

Les capsules étant maintenant recouvertes de cellules endothéliales, elles sont injectées dans la chambre microfluidique destinée à retenir les capsules afin de former l'empilement de microsphères. Cet empilement est alors ensuite perfusé avec du milieu de culture à un débit contrôlé afin d'imposer une force de cisaillement à la surface des capsules de l'ordre physiologique de 1 à 10 dynes/cm².

6.2.1 Formation de l'empilement

Avant injection des capsules, le diamètre des microsphères est mesuré car ce paramètre influe sur le cisaillement moyen à la surface des microsphères. Pour cela, le logiciel de traitement d'image ImageJ est utilisé. Les microsphères étant en réalité des ellipsoïdes, le grand diamètre et le petit diamètre de 100 microsphères sont mesurés. La moyenne de ces



(a) Injection des capsules dans la carte à l'aide d'une pipette. (b) Chambre contenant l'empilement de microsphères recouvertes de HMECs-GFP.

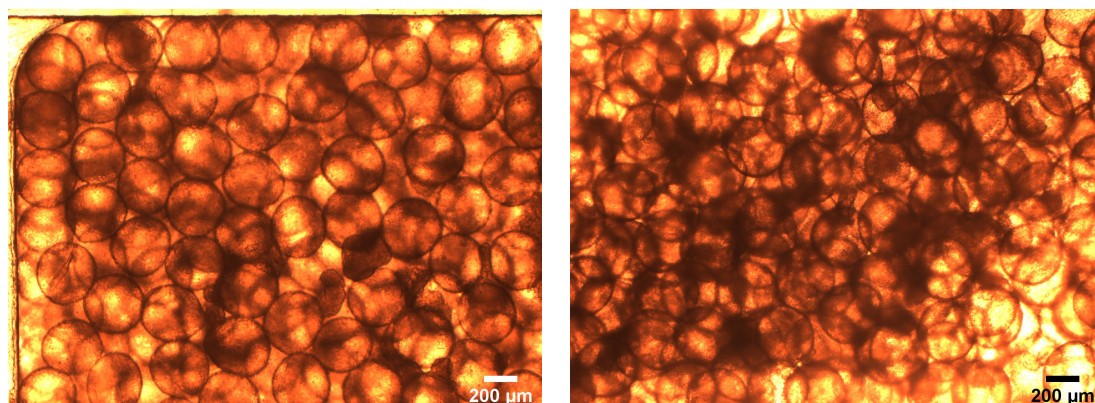
FIGURE 6.10 – Injection des capsules dans la carte microfluidique.

deux diamètres sur l'ensemble des 100 microsphères nous donne le diamètre moyen des microsphères. On peut également en déduire la sphéricité moyenne des microsphères et le coefficient de variation de tailles, mais nous décidons de ne pas tenir compte de l'influence de ces paramètres dans le cadre de notre étude.

L'empilement est formé par injection des microsphères au sein de la chambre microfluidique. La solution la plus efficace pour injecter les capsules au sein de la chambre sans insertion de bulles d'air est l'utilisation d'une pipette. Le milieu contenant les microsphères recouvertes est délicatement resuspendu à la pipette afin de séparer les gros agglomérats de cellules sans détacher les cellules endothéliales de la surface. L'injection est à appliquer délicatement afin de ne pas générer de stress important aux cellules et de ne pas provoquer une pression trop importante qui pourrait engendrer un passage des capsules à travers le filtre. Comme les microsphères forment des agglomérats, il est fréquent qu'un amas de microsphères bloque au niveau des connectiques d'entrée de la carte microfluidique. Lorsque cela arrive, le milieu est aspiré et réinjecté délicatement à plusieurs reprises afin de remettre en suspension les microsphères dans le milieu et provoquer le détachement des microsphères les unes des autres.

Les microsphères ont un diamètre adapté à la diffusion des nutriments et de l'oxygène. Ainsi, toutes les cellules potentiellement encapsulées dans les microsphères auront accès aux composants nutritifs véhiculés par le futur réseau sanguin se développant dans l'espace interstitiel de l'empilement. Entre 2000 et 3000 capsules sont injectées selon les expériences.

Une photographie d'un empilement typique de microsphères recouvertes de cellules HMECs-GFP obtenu par injection à la pipette est présentée Figure 6.11. Un microscope



(a) Photographie de la couche inférieure de l'empilement après injection au niveau de la marche microfluidique.

(b) Photographie d'une couche sus-jacente au coeur de l'empilement.

FIGURE 6.11 – Formation de l'empilement de microsphères de SLM2-Col3 recouvertes de cellules HMECs-GFP.

inversé est utilisé pour l'observation de la chambre. On note dans un premier temps que les microsphères sont efficacement retenues par le filtre mécanique. Nous observons une rigidité accrue des microsphères recouvertes de cellules endothéliales réduisant leur déformabilité. On observe également la présence de clusters de cellules endothéliales au sein de l'empilement (zones sombres sur la photo). Ces clusters se forment lors du développement de la couche endothéliale à la surface des microsphères au sein de la flasque de culture de cellules non-adhérentes : les cellules n'ayant pas adhéré aux microsphères se rejoignent et forment des amas. Lors du transfert des microsphères de la flasque de culture à la chambre microfluidique, ces amas de cellules sont également prélevés et injectés dans la chambre. La majorité de ces amas traverse le filtre et est évacué de la chambre lors de l'injection des microsphères, mais il arrive que les plus gros restent coincés au sein de l'empilement (Figure 6.11a). Sur cette photographie, la couche inférieure de l'empilement de sphères est montrée. Cependant, il n'est pas possible d'observer les couches plus hautes de sphères : les cellules ne sont pas totalement transparentes ce qui perturbe l'observation des couches supérieures (Figure 6.11b). Cette non-transparence complique l'observation de l'évolution des cellules endothéliales au coeur de l'empilement et la détection d'éventuels capillaires.

6.2.2 Culture et perfusion des cellules endothéliales

Une fois l'empilement formé, nous souhaitons perfuser la construction tissulaire de sorte à imposer une contrainte de cisaillement de l'ordre de 1 à 10 dynes/cm² aux cellules endothéliales et provoquer leur alignement le long des lignes de courant et la formation des capillaires. Nous avons vu que la formule 6.1, établie dans le chapitre Ecoulement au sein d'un empilement de microsphères - section 5.2.1.4, fournissait un ordre de grandeur

proche du cisaillement moyen au sein de l'empilement de sphères :

$$\tau = 12\mu \cdot \frac{(1 - \epsilon)}{\epsilon^2} \cdot \frac{Q}{S \cdot d} \quad (6.1)$$

avec μ la viscosité dynamique, ϵ la porosité de l'empilement, Q le débit, S la section du canal et d le diamètre des microsphères. Nous utiliserons cette expression afin d'imposer un cisaillement moyen au sein de l'empilement. Les empilements étant perfusés par du milieu de culture au sein d'une enceinte à 37°C, nous apparenterons le milieu à de l'eau pour la valeur de la viscosité dynamique, soit $\mu(37^\circ C) = 0.692$ cPo. De plus, comme il est difficile de mesurer la porosité de l'empilement au vu de la non-transparence des microsphères recouvertes, nous calculerons la contrainte de cisaillement moyenne imposée pour une valeur limite minimale de porosité $\epsilon_{min} = 0.26$ et maximale de $\epsilon_{max} = 0.44$.

6.2.2.1 Système de perfusion type bioréacteur

Une fois l'empilement formé, la chambre est perfusée en continue à l'aide d'une pompe péristaltique au sein d'un circuit fermé présenté Section 3.2.4. L'ensemble est placée dans un incubateur afin que les cellules soient cultivées à 37°C. La pompe péristaltique est reliée à une bouteille contenant le milieu de culture et perfuse la chambre microfluidique. La sortie de la chambre microfluidique retourne vers la bouteille de culture afin que la chambre soit alimentée en continue. Le circuit fermé présente l'avantage de ne nécessiter aucune intervention de notre part afin de recharger la bouteille de milieu de culture.

Des filtres 0.22 μm sont intégrés à la bouteille contenant le milieu de culture afin d'assurer les échanges gazeux entre le milieu de perfusion et l'enceinte de culture à 37°C et 5% de CO₂.

6.2.2.2 Croissance des cellules endothéliales au sein de l'empilement

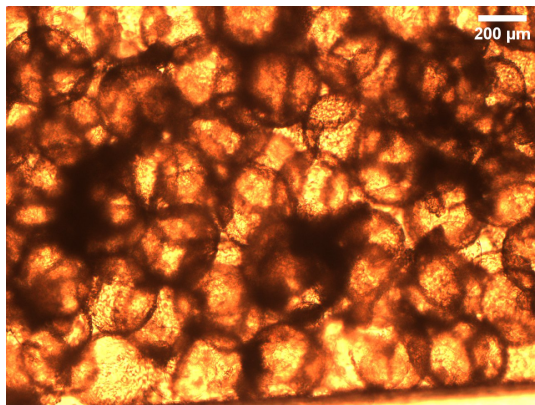
Les premières expériences de création d'empilement et perfusion de la construction ont été réalisées au sein d'un canal microfluidique de largeur 1.8 mm et de hauteur 1 mm. Des microsphères de diamètre d'environ 350 μm sont injectées. Au sein d'une telle chambre, une section transverse du canal contient entre 3 et 5 billes sur l'épaisseur et approximativement 6-8 billes sur la largeur. Lors de l'injection et de la perfusion de l'empilement, certaines microsphères recouvertes traversent le filtre de rétention. Avec le filtre conçu et le biopolymère utilisé, il n'est alors pas possible d'utiliser des débits de perfusion importants sans provoquer de déstructuration de l'empilement. Le débit limite pour lequel les microsphères traversent la marche varie d'une expérience à une autre mais est généralement proche de 300-400 $\mu\text{L}/\text{min}$. Par la suite, une nouvelle carte microfluidique a été conçue, intégrant un canal à section plus grande de largeur 3 mm et de hauteur 2 mm permettant l'injection d'un nombre plus important de microsphères. Cette épaisseur permet de s'assurer que les cellules cultivées au centre de l'empilement soient suffisamment éloignées des parois pour ne pas être alimentées par l'écoulement circulant au niveau de la paroi. La

bonne viabilité des cellules du coeur de l'empilement serait ainsi un gage de la circulation du fluide au sein de l'empilement de sphères.

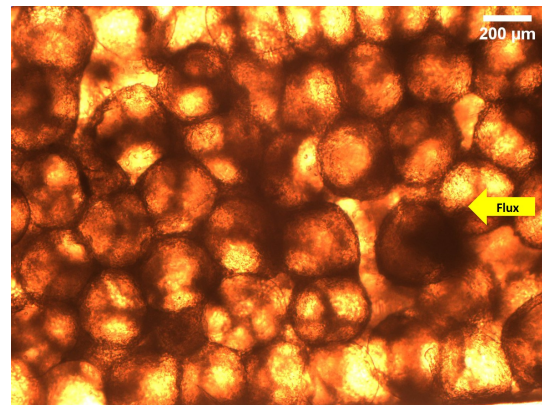
Les premières cartes microfluidiques intégrant ces canaux étaient conçues par usinage et scellement de blocs de COC. Elles ne permettaient pas une ouverture de la carte et une récupération de la construction tissulaire. Seule l'observation optique de la carte transparente est possible ce qui limite grandement les caractérisations réalisables. Ces premières cartes nous ont servi à nous familiariser avec l'expérience de formation de l'empilement et de perfusion tout en observant l'évolution de la construction tissulaire au cours du temps.

Sur la Figure 6.12, des microsphères de diamètre moyen $315 \mu\text{m}$ recouvertes de cellules endothéliales, cultivées durant 3 jours avant l'injection, ont été empilées dans la chambre microfluidique. La construction a été perfusée durant 1 jour à $100 \mu\text{L}/\text{min}$ puis 3 jours supplémentaires à $200 \mu\text{L}/\text{min}$, de sorte à imposer une contrainte de cisaillement comprise entre $0.71 - 2.67 \text{ dyn}/\text{cm}^2$ le premier jour et $1.41 - 5.34 \text{ dyn}/\text{cm}^2$ les trois jours suivants. On observe visuellement l'évolution des cellules endothéliales au sein de l'empilement de microsphères durant ces 4 jours de perfusion (Figure 6.12). Les premiers jours, on distingue chaque capsule et l'espace interstitiel entre elles (Figure 6.12a & b). Au cours de la perfusion, les cellules se développent et semblent combler les espaces inter-billes en formant des jonctions entre les capsules. Au bout de 3 jours de perfusion, nous ne distinguons plus de pores ouverts non envahis par les cellules endothéliales en lumière blanche (Figure 6.12c-e). Comme nous ne pouvons qu'observer l'empilement par le dessus ou le dessous de la carte, nous observons l'empilement au niveau d'une section longitudinale à la direction du flux. Dans cette direction nous nous apercevons que les cellules endothéliales se développent au sein de l'espace inter-sphères. Des caractérisations supplémentaires sont nécessaires, mais impossible à réaliser sur de telles cartes, car la chambre ne peut être ouverte, donc le tissu ne peut être récupéré.

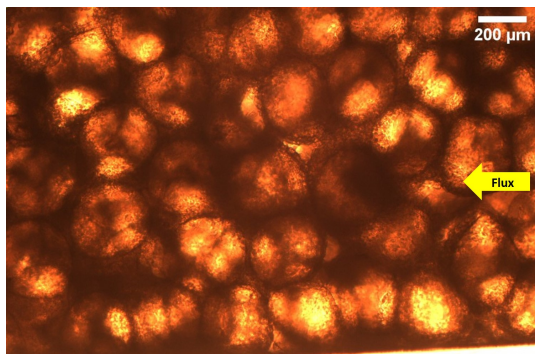
L'observation de la fluorescence des cellules permet de distinguer plus aisément les cellules au sein de la construction. La Figure 6.13 montre le développement des cellules endothéliales au sein de l'empilement perfusé. En comparant une même zone de l'empilement, entre 1 jour et 2 jours de perfusion, on observe que les amas de cellules se dissocient et s'étalent sur les sphères, signe que l'environnement est favorable pour les cellules (Figure 6.13a & b). Les cellules endothéliales se développent en peuplant les espaces vides de l'empilement. On peut distinguer plusieurs microsphères ne possédant pas de cellules endothéliales à leur surface au moment de l'injection (Figure 6.13a), être recouvertes de cellules après quelques jours de perfusion (Figure 6.13b). Sur ces images, nous notons que les espaces vides inter-billes sont comblés par les cellules endothéliales qui forment des liaisons entre les sphères. Au bout de 2-3 jours de perfusion, il n'est plus possible de distinguer des espaces vides inter-billes avec une vue aérienne de l'empilement. Néanmoins, nous espérons que l'application du flux physiologique empêche l'obturation des pores au niveau d'une tranche transverse à la direction globale du flux. Si l'on se focalise sur la couche sus-jacente, il est possible de détecter les cellules à travers les capsules faiblement recouvertes de cellules endothéliales (Figure 6.13c & d). Sur cette couche située au coeur de l'empilement, il semblerait que les cellules s'alignent dans la direction du flux au sein



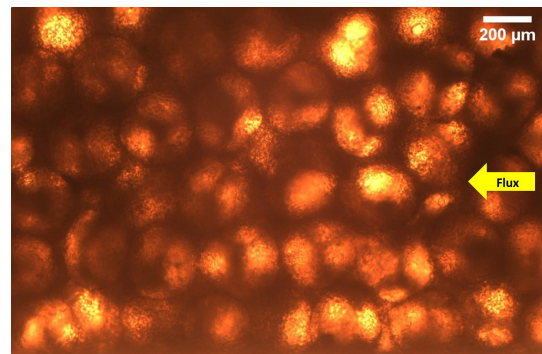
(a) Injection des microsphères.



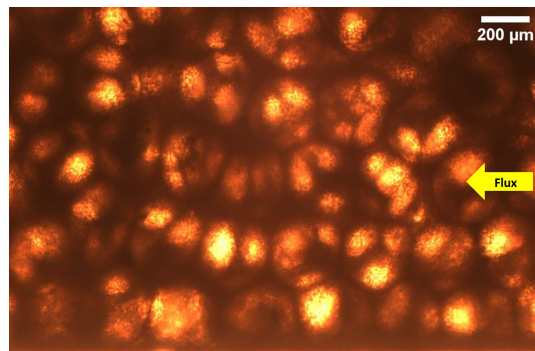
(b) 1 jour de perfusion à 100 $\mu\text{L}/\text{min}$.



(c) 1 jour de perfusion à 100 $\mu\text{L}/\text{min}$ + 1 jour à 200 $\mu\text{L}/\text{min}$.



(d) 1 jour de perfusion à 100 $\mu\text{L}/\text{min}$ + 2 jours à 200 $\mu\text{L}/\text{min}$.



(e) 1 jour de perfusion à 100 $\mu\text{L}/\text{min}$ + 3 jours à 200 $\mu\text{L}/\text{min}$.

FIGURE 6.12 – Développement des cellules endothéliales au sein de l'empilement de sphères perfusé.

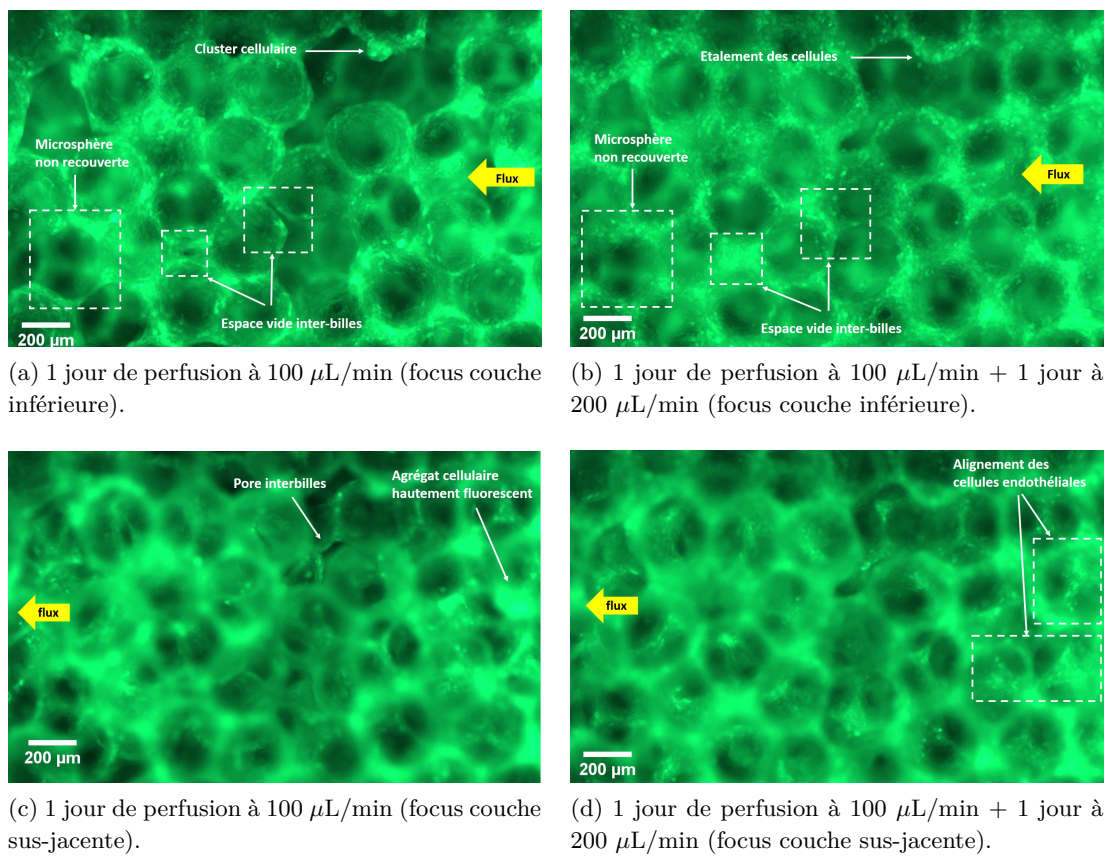


FIGURE 6.13 – Evolution de la fluorescence des cellules HMECs-GFP.

des pores inter-billes (Zones en pointillées de la Figure 6.13d).

Une vue totale de l'empilement à 2 jours et 3 jours de perfusion est montrée Figure 6.14. Comme on peut le voir, des microsphères se sont bloquées au niveau du filtre de rétention (partie droite des images). Certaines ont traversé le filtre lors de l'injection et au début de la perfusion, mais la structure établie s'est stabilisée. Nous ne détectons pas de changements notoires des cellules endothéliales entre 2 jours et 3 jours de perfusion. Il est intéressant de noter que, pour cette expérience, les microsphères périphériques sont plaquées contre la paroi et nous ne distinguons pas une rétraction de l'empilement, comme cela a pu être observée par Matsunaga *et al.* avec leur empilement de sphères endothélialisées au sein d'un moule [258]. De plus, les microsphères plaquées contre la paroi ne possèdent pas de cellules endothéliales au niveau de la surface écrasée, il est ainsi possible d'observer par transparence à travers ces microsphères.

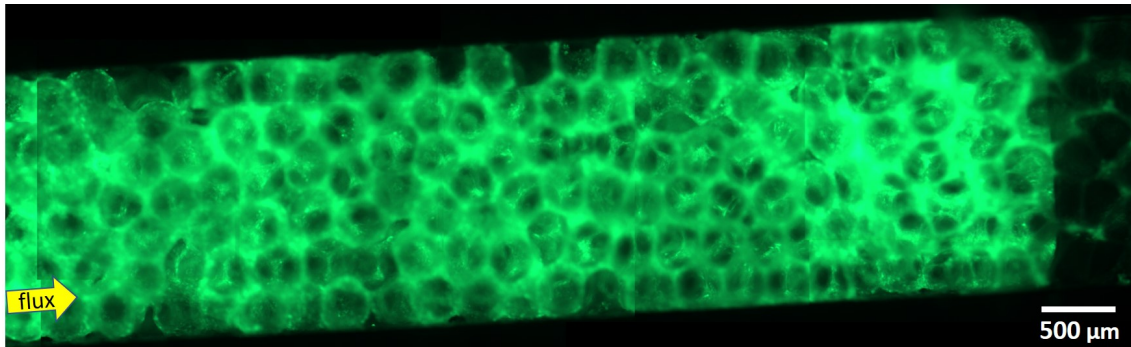
Alignement des cellules endothéliales

Sur la Figure 6.15, il nous semble observer un alignement des cellules endothéliales le long des lignes de courant. Cet alignement est surtout visible pour les cellules se développant au niveau de la marche mécanique, où les couches de microsphères sous-jacentes ne perturbent pas la visualisation (Figure 6.15). Les alignements sont surtout détectés dans les couches de microsphères de coeur de l'empilement, au niveau des rapprochements entre deux capsules où les pores sont resserrés et le cisaillement y est plus important (Figure 6.15b & c). L'alignement des cellules semble moins évident sur les couches périphériques de l'empilement que l'on observe, bien que l'on ait tout de même l'impression d'observer une orientation globale des cellules dans la direction du flux (Figure 6.15d). L'écoulement est imposé afin d'induire un cisaillement de l'ordre de 2 à 10 dynes/cm² à la surface des parois. Cet écoulement induit une orientation des cellules endothéliales le long des lignes de courant. Il faut maintenant vérifier si cet alignement permet la formation de capillaires au sein de l'espace interstitiel de l'empilement.

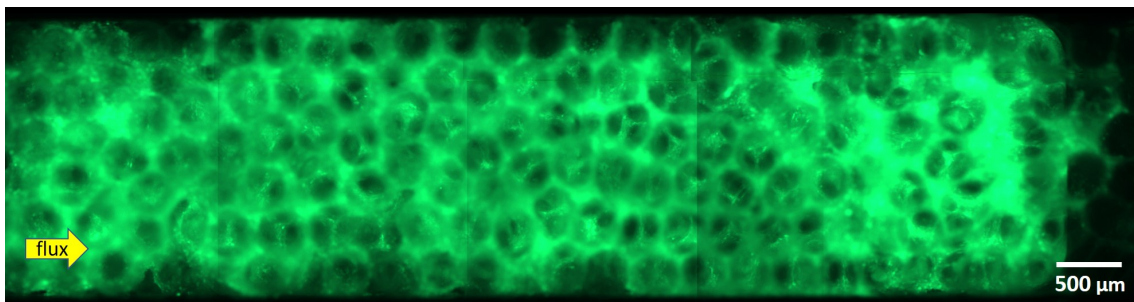
6.2.2.3 Perfusion de particules fluorescentes

Au cours des expériences, des particules fluorescentes ont été injectées dans l'empilement afin d'observer leur trajet au sein de la chambre microfluidique. Selon les expériences, ces particules étaient soit des microbilles fluorescentes rouges de diamètre 3 μm , soit des globules rouges (GR) prélevés chez la souris et modifiés afin d'exprimer une fluorescence rouge.

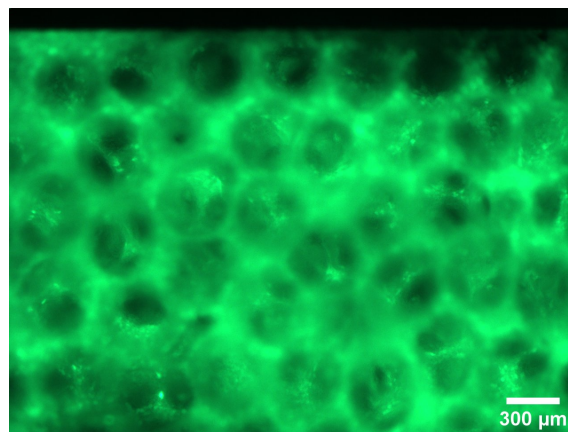
Au sein de l'empilement de microsphères présenté Figure 6.14, des globules rouges extraits de souris sont injectés au sein de l'empilement après 4 jours de perfusion pour un cisaillement moyen de 0.71-2.67 dyn/cm² durant 1 jour et 1.41-5.34 dyn/cm² durant les 3 suivants. Les globules rouges expriment une fluorescence rouge pouvant être détectée au microscope. On peut voir Figure 6.16a les globules rouges pénétrant l'empilement de sphères. Seuls les globules rouges circulant au niveau des parois sont détectables au micro-



(a) 1 jour de perfusion à 100 $\mu\text{L}/\text{min}$ + 1 jour à 200 $\mu\text{L}/\text{min}$ (focus couche sus-jacente).



(b) 1 jour de perfusion à 100 $\mu\text{L}/\text{min}$ + 2 jours à 200 $\mu\text{L}/\text{min}$ (focus couche sus-jacente).



(c) Absence de cellules endothéliales au niveau de la paroi permettant l'observation au travers les microsphères.

FIGURE 6.14 – Vue globale de tout l'empilement focalisé au niveau d'une couche intermédiaire de l'empilement.

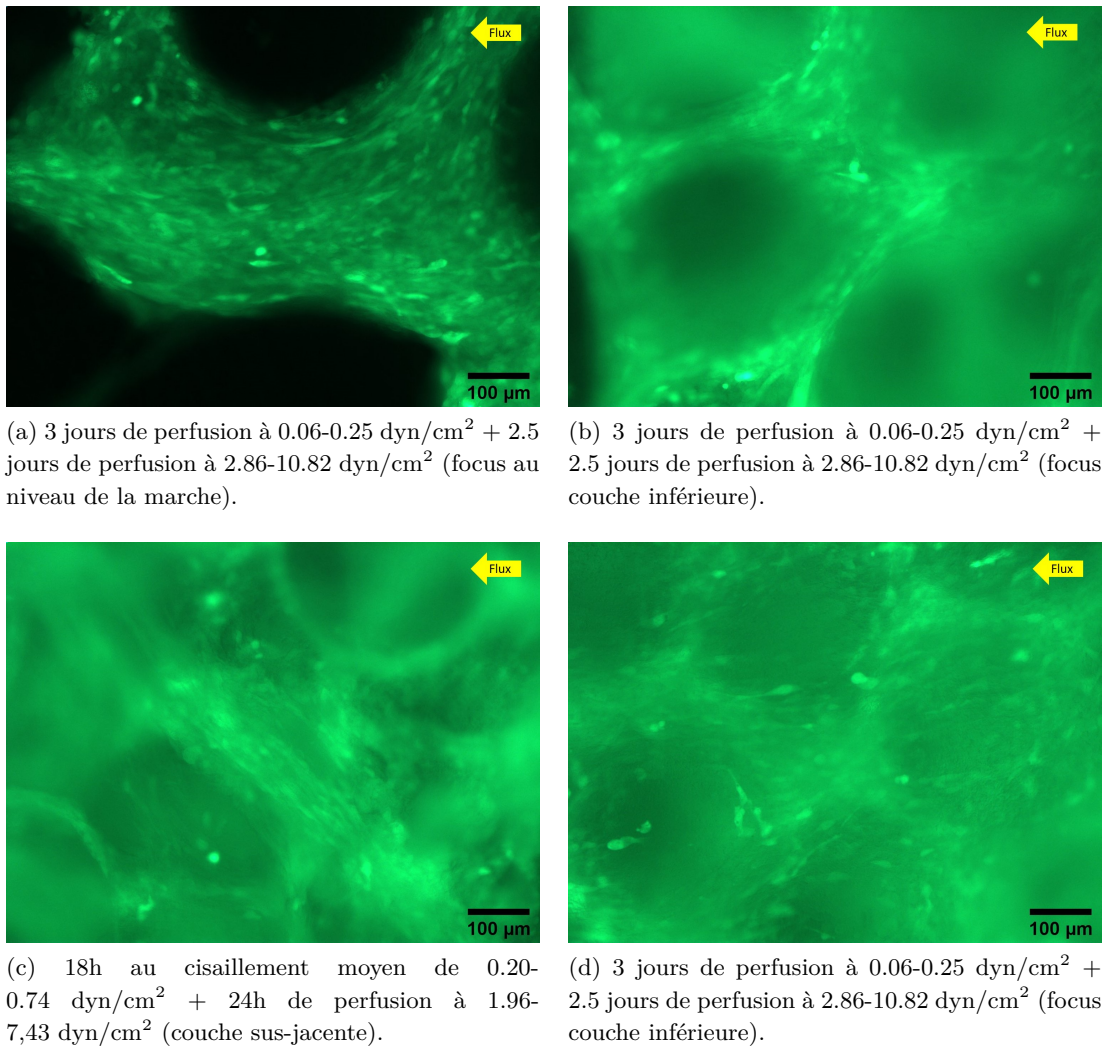
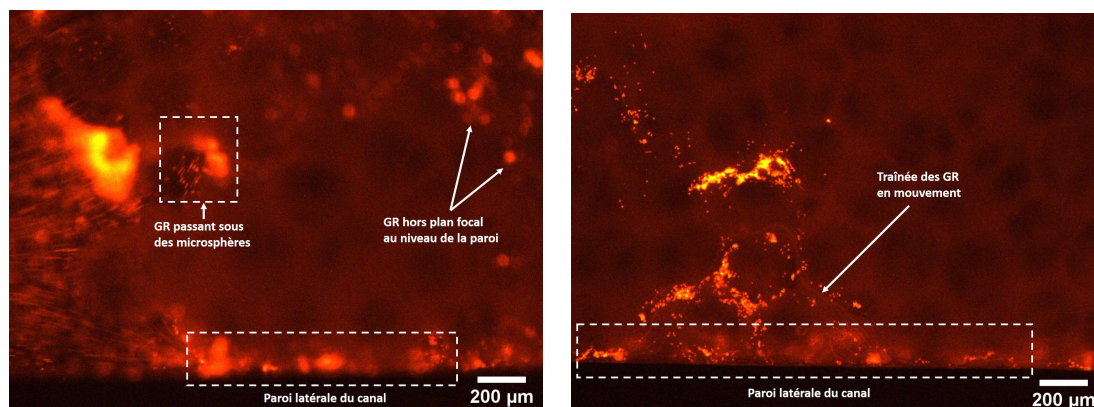


FIGURE 6.15 – Alignement des cellules le long des lignes de courant.



(a) Globules rouges pénétrant l'empilement.

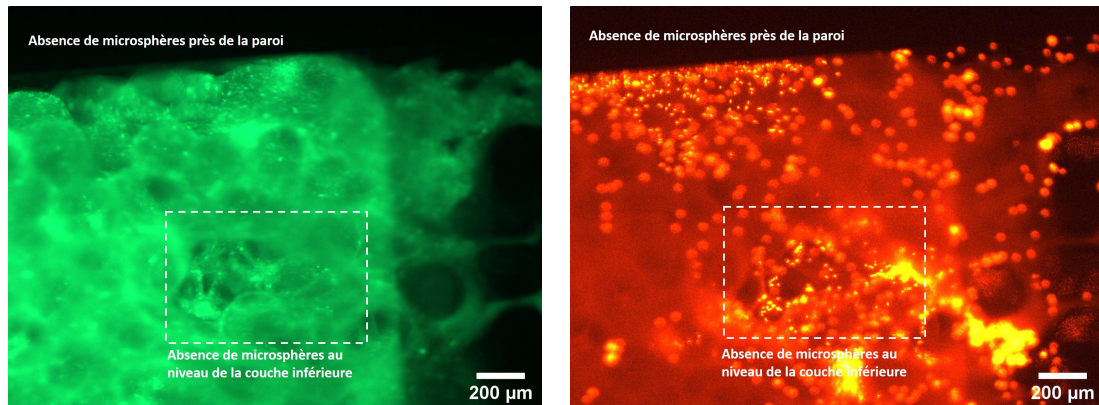
(b) Globules rouges circulant entre la couche inférieure de sphères et la paroi.

FIGURE 6.16 – Injection de globules rouges fluorescents au sein de l'empilement de sphères perfusé durant 4 jours (1 jour au cisaillement moyen de $0.71\text{-}2.67 \text{ dyn/cm}^2$ et 3 jours à $1.41\text{-}5.34 \text{ dyn/cm}^2$).

scope. Ceux situés au-dessus des microsphères recouvertes de cellules endothéliales ne sont pas visualisables. Il est ainsi difficile d'affirmer que le flux circule au sein de l'empilement de sphères par la seule observation des globules rouges. Sur l'image Figure 6.16a, on voit que les globules rouges pénètrent l'empilement en passant au dessus des microsphères, mais il n'est pas possible de savoir si les particules fluorescentes circulent au coeur de l'empilement ou entre l'empilement et la paroi du microcanal. De nombreuses particules sont observées au niveau de la paroi latérale du canal. Sur la Figure 6.16b, on observe quelques globules rouges circulant en-dessous de l'empilement contre la paroi. On note également que le contour des microsphères est visible sur ces photos, signe que les cellules endothéliales auto-fluorescent à cette longueur d'onde d'excitation.

Lors d'une autre expérience, des microbilles fluorescentes de $3 \mu\text{m}$ ont été injectées au sein d'un empilement perfusé durant 3 jours à $0.06\text{-}0.25 \text{ dyn/cm}^2$ et 3 jours à $2.86\text{-}10.82 \text{ dyn/cm}^2$. Par chance, une lacune s'est formée dans la couche inférieure de capsules et permet ainsi d'observer une petite portion de la couche de microsphères sus-jacente (Figure 6.17a). Quelques microbilles sont détectées au sein de cet espace (Figure 6.17b). On peut penser que ces microbilles proviennent du coeur de l'empilement et sont détectées grâce à l'absence de microsphères perturbant la visualisation des particules. Ainsi, du flux circulerait au niveau de cette couche intermédiaire démontrant la perfusabilité de l'empilement.

La seule observation du trajet de particules fluorescentes suivant les mouvements de fluide au sein de l'empilement permet d'observer les trajets préférentiels au niveau des couches périphériques de l'empilement. L'opacité de l'empilement ne permet pas de détecter de microbilles de manière catégorique dans le coeur de l'empilement et ne peut ainsi servir de gage de la perfusabilité du réseau poreux endothélialisé développé. D'autres ca-



(a) Focalisation au niveau d'une couche sus-jacente.

(b) Microbilles fluorescentes transportées par le milieu de culture.

FIGURE 6.17 – Injection de microbilles fluorescentes au sein de l'empilement de sphères perfusé durant 6 jours (3 jours au cisaillement moyen de $0.06-0.25 \text{ dyn/cm}^2$ et 3 jours à $2.86-10.82 \text{ dyn/cm}^2$).

ractérisations doivent être effectuées afin d'appuyer nos hypothèses.

Les cellules endothéliales se développent au sein de l'empilement et semblent s'aligner au niveau des espaces inter-billes. Les cellules comblent les espaces interstitiels entre les microsphères et atteignent une densité importante. Nous souhaitons néanmoins éviter la formation de bouchons au sein de notre empilement car l'obturation des pores empêcherait le passage du fluide au sein de l'empilement et donc l'alimentation des cellules potentiellement encapsulées dans les microsphères. Ainsi, nous cherchons à vérifier la perfusabilité du coeur de notre construction. La seule observation de l'évolution des couches inférieures et supérieures de l'empilement ne permet pas de conclure de la perfusabilité de l'empilement. Des caractérisations supplémentaires sont nécessaires afin de conclure de la circulation du flux au sein des pores endothélialisés.

6.3 Caractérisation du réseau de capillaires

Nous souhaitons démontrer la perfusabilité du réseau poreux endothélialisé. Dans ce but, nous avons modifié la carte microfluidique afin de pouvoir extraire le tissu en fin d'expérience et procéder à des découpes de la construction afin d'analyser l'espace poreux du coeur de l'empilement. Pour cela, la conception de la carte microfluidique a été légèrement modifiée. L'architecture et l'usinage des canaux microfluidiques sont reproduits de manière identique, mais la fermeture de la carte par scellement d'un bloc de COC est cette fois-ci effectuée sur une seule face de la carte. L'autre face est elle refermée à l'aide d'un film adhésif transparent. Ainsi, en fin d'expérience, le film adhésif peut être décollé et l'empilement de sphères récupéré afin d'effectuer des analyses.

6.3.1 Analyse de sections transverses à la direction de l'écoulement

Le cryomicrotome est une machine de découpe permettant d'effectuer des tranches d'épaisseur contrôlée au sein d'un bloc d'OCT (pour Optimal Cut Temperature compound) congelé. L'OCT est un matériau contenant la construction tissulaire idéal pour la découpe au cryostat, des tranches d'épaisseur de quelques microns peuvent être réalisées. Dans la pratique, la découpe de tranches fines de notre empilement est difficile et sur de nombreuses expériences, des tranches d'au-minimum $50 \mu\text{m}$ ont pu être découpées. Pour de telles épaisseurs de coupe, il est difficile d'observer des lumens creux à moins que le capillaire soit développé dans la direction exactement transverse au plan de coupe. Un protocole de récupération du tissu et préparation pour la découpe au cryomicrotome a été mis en place. Le film adhésif fermant la carte est décollé et l'empilement de sphères est récupéré à l'aide d'une spatule. L'ensemble est prélevé facilement car les cellules n'adhèrent pas aux parois, et l'empilement de sphères se tient facilement grâce aux liaisons entre les cellules. La mise en place du tissu dans le bloc d'OCT avant sa gélification est une étape importante et délicate car elle détermine l'orientation des sections étudiées. Nous plaçons le tissu de sorte à effectuer des sections transverses à la direction du flux de perfusion.

Pour les premières tentatives de récupération du tissu, nous souhaitions injecter un gel d'agarose juste avant l'extraction du tissu afin de gélifier la structure contenue dans la chambre. Cette initiative s'est révélée ne pas être concluante car la viscosité de l'agarose combinée aux faibles tailles de pores empêchait la pénétration de l'agarose au sein des pores de l'empilement. La perfusion de l'agarose a alors généré une forte pression au sein du canal microfluidique provoquant la détérioration de l'empilement et le passage à travers le filtre mécanique. Néanmoins, une petite partie de l'empilement a pu être récupérée et des premiers tests de coupes réalisés à l'aide du cryomicrotome.

L'observation des sections transverses montre les microsphères formant l'empilement séparées les unes des autres par une densité de cellules endothéliales (Figure 6.18a). Alors qu'on distingue aisément les grands diamètres des sections des microsphères, on observe également des espaces noirs au sein des couches de cellules endothéliales entre les capsules (Figure 6.18b, c & d). Il est difficile de discerner si ces cercles noirs sont des extrémités de microsphères dont une section crée un disque, ou bien si ces espaces sont des pores dans lesquels le flux de perfusion circule. La seule observation de la fluorescence des cellules endothéliales permet difficilement d'affirmer ou d'infirmer l'une ou l'autre des hypothèses. Cependant, on remarque que certains contours sont bien délimités avec un aspect arrondi (bord de microsphères probablement) alors que certains contours sont moins arrondis et bien délimités. Ces dernières pourraient être plutôt des pores ou des sections de capillaires. Néanmoins, cette expérience permet de nous rendre compte de la densité des cellules endothéliales au sein de l'empilement. Il semble que les cellules forment des liaisons entre elles et combler les espaces vides entre les microsphères. Pour cet empilement, les microsphères ont été injectées après 3 jours de culture et l'empilement a été perfusé durant 3 jours complets pour un cisaillement moyen d'environ 1.3 dyn/cm^2 le premier jour et 5 dyn/cm^2 les deux jours suivants. Il faudrait alors observer l'évolution de la densité cellulaire au sein de

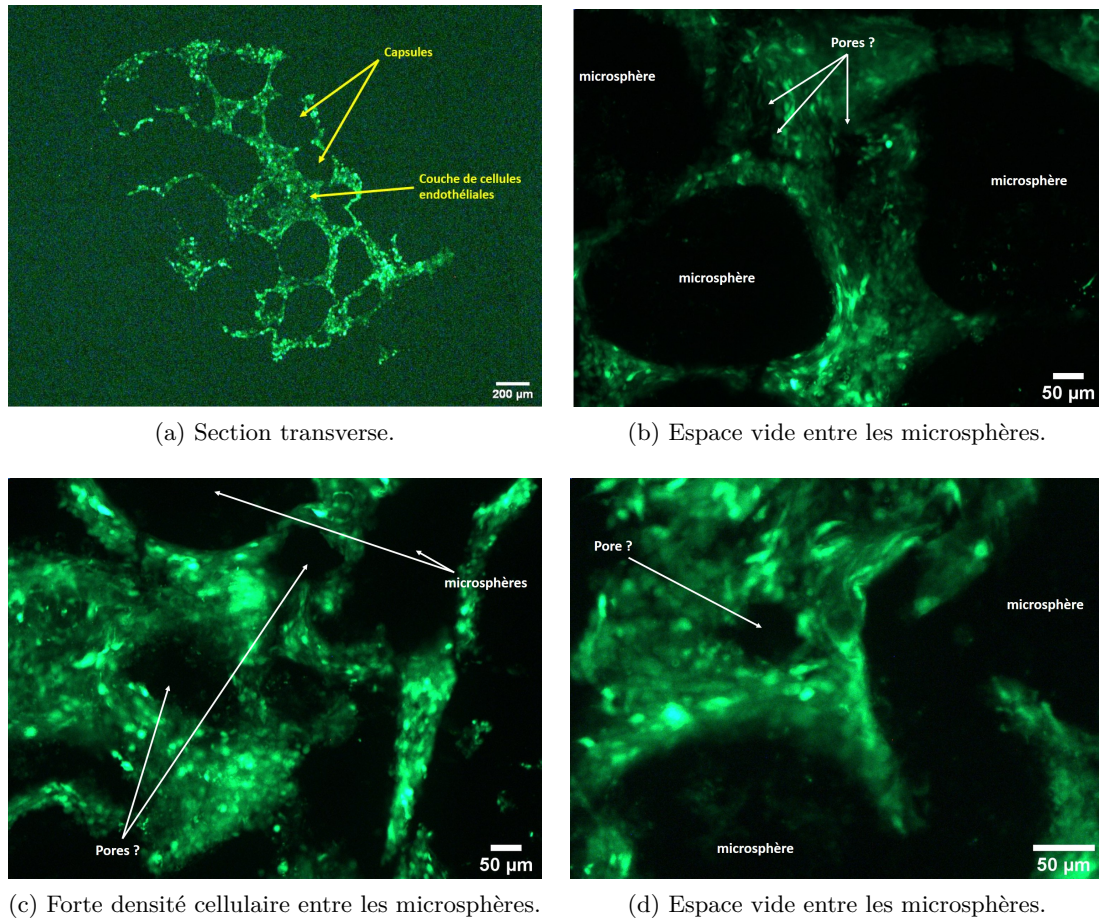


FIGURE 6.18 – Analyse de sections transverses d’un empilement perfusé durant 1 jour à 1.3 dyn/cm^2 puis 2 jours à 5 dyn/cm^2 .

sections transverses de l’empilement au cours du temps, mais cela nécessite de nombreuses expériences successives difficiles à mettre en place.

Une autre expérience d’injection d’agarose afin de rigidifier la structure a été réalisée. La concentration de l’agarose a été divisée par deux (0.6% contre 1.2% précédemment) afin de réduire la viscosité de la solution, mais là encore, l’injection a provoqué une détérioration de l’empilement. L’injection de l’agarose s’est finalement révélée inutile pour la récupération de l’échantillon en fin d’expérience. En effet, il est possible de décoller le film adhésif et récupérer l’empilement à l’aide d’une spatule adaptée. Comme les cellules n’adhèrent pas aux parois du canal, l’empilement s’extraît facilement du canal et les jonctions cellulaires entre les capsules maintiennent la structure.

6.3.2 Perfusion de lectine

Nous cherchons à prouver la formation d'un réseau de tubes recouverts de cellules endothéliales dans les interstices de l'empilement de billes. Les réseaux de capillaires sanguins développés dans la littérature ne sont pas toujours perfusables, c'est pourquoi les échantillons sont généralement découpés, puis un marquage des noyaux des cellules et des jonctions entre les cellules est effectué sur les découpes. L'objectif de cette découpe et du marquage est d'observer des structures creuses entourées de cellules endothéliales (visibles par le marquage du noyau) liées entre elles (visibles par le marquage des jonctions). Ces deux points sont caractéristiques de la présence d'un capillaire sanguin. Lorsque le réseau formé est en plus perfusable, des caractéristiques supplémentaires des réseaux sanguins sont généralement vérifiées afin de prouver les bonnes propriétés physiologiques des vaisseaux, notamment la perméabilité de l'endothélium. La perméabilité des vaisseaux est vérifiée par perfusion de molécules Dextran de différentes tailles afin de déterminer la porosité des vaisseaux. Cependant, cette technique est limitée à des constructions de faible épaisseur de l'ordre de 100 à 200 μm généralement. Ainsi, il est possible d'observer par une vue du dessus l'évolution de la diffusion du Dextran au sein du réseau. Dans notre cas où le réseau se forme au sein d'un tissu épais, cette méthode ne peut pas être utilisée.

Pour notre application, les cellules endothéliales utilisées sont fluorescentes et le tissu formé est épais et opaque. Il ne nous est donc pas possible par simple microscopie de prouver la formation de capillaires sanguins. Ainsi, nous avons conçu la chambre microfluidique de sorte à pouvoir l'ouvrir et récupérer le tissu afin d'effectuer des observations supplémentaires. Nous décidons pour cela de perfuser en fin d'expérience un marqueur des cellules endothéliales au sein de notre réseau. La lectine est une protéine qui se lie spécifiquement à certains glucides. Notamment, la lectine DyLight 594 Lycopersicon Esculentum marque spécifiquement les cellules endothéliales. Un fluorophore y a été greffé afin que cette protéine fluoresce en rouge. En perfusant la lectine, nous espérons que la lectine pénètre au sein du réseau capillaire et se lie aux cellules endothéliales en contact avec le flux, leur conférant ainsi une fluorescence rouge.

Suite à la perfusion, notre construction tissulaire est récupérée et des découpes de l'empilement dans la direction transverse au flux sont effectuées. De cette manière, nous pourrions vérifier sur chaque tranche de découpe la formation de lumens entourés de cellules endothéliales. Si on détecte en plus la lectine au sein de ces tubes creux, alors cela signifiera que la lumière a été perfusée.

Un empilement de microsphères est alors réalisé avec des sphères recouvertes de cellules endothéliales et cultivées hors carte durant 2 jours. Une fois injectées en cartes, les microsphères sont perfusées durant 18 heures avec un flux générant un cisaillement moyen de 0.2-0.74 dyn/cm^2 puis 4 jours avec un cisaillement moyen de 1.96-7.43 dyn/cm^2 . Après ces 5 jours de perfusion, la lectine fluorescente est injectée au sein de la chambre microfluidique à la concentration conseillée par le producteur durant 30 minutes à la concentration de 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Du milieu ne contenant pas de lectine est ensuite perfusé afin de laver la

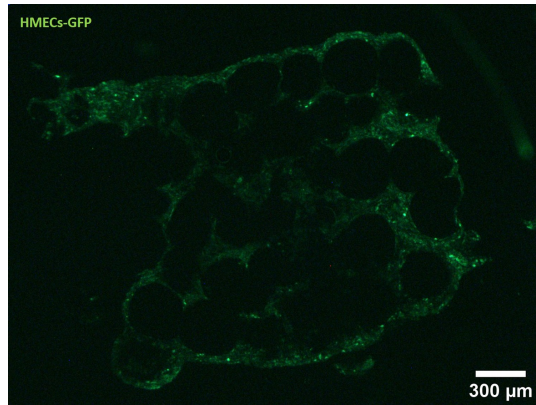
chambre. L'empilement de sphères est alors récupéré, puis transféré successivement dans des bains de sucrose et de paraformaldéhydes (PFA) afin de fixer les protéines. La construction est alors placée au sein d'un gel OCT et des sections de l'empilement de 50 μm sont effectuées.

La majorité des sections étudiées présente les mêmes critères. Une des sections est montrée Figure 6.19a. La visualisation de la fluorescence rouge de cette même section (Figure 6.19b) révèle une fluorescence au niveau du périmètre de la section. Cela signifierait que la lectine a été perfusée essentiellement au niveau des parois du canal. Lorsque l'on observe plus précisément les espaces inter-capsules, on découvre des espaces vides pouvant être soit une section d'une capsule au niveau d'une extrémité, ou bien des pores inter-billes endothélialisés (Figure 6.19c & e). De la fluorescence rouge est légèrement observée sur ces images, mais son intensité est très faible. Les images de fluorescence rouges ont été retouchées afin d'augmenter le contraste et permettre la visualisation (Figure 6.19d & f). La fluorescence de la périphérie de l'empilement est indéniable, signe que la lectine a bien adhéré aux cellules. Si l'on compare l'intensité de la fluorescence au niveau des couches de cellules inter-capsules, il semble que la lectine n'a pas atteint les cellules et donc que le milieu n'a pas perfusé le coeur de l'empilement. Nous pensons que la légère fluorescence rouge observée serait due à de l'auto-fluorescence des cellules endothéliales. Néanmoins, cette auto-fluorescence n'est pas toujours observée avec cette même intensité. Si cela était effectivement de l'auto-fluorescence, elle semble dépendre de l'épaisseur des tranches de découpe, et de l'état des cellules endothéliales.

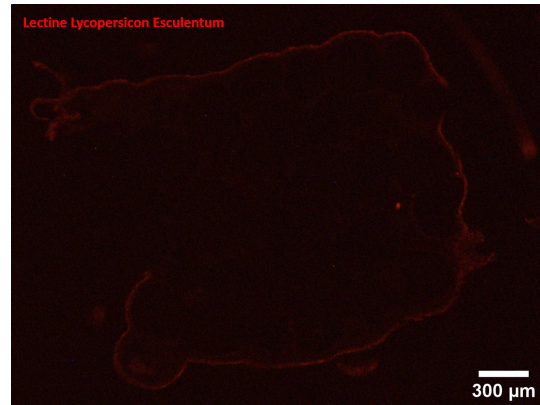
Il semble que l'empilement soit bouché au bout de 5 jours de perfusion. Nous réitérons l'expérience en modifiant les conditions de perfusion. Cette fois-ci, l'empilement est formé avec des microsphères recouvertes de cellules endothéliales et cultivées durant 1 jour. Les microsphères sont alors injectées en carte et l'empilement est perfusé durant 3 jours et demi, imposant un cisaillement moyen au niveau des parois compris entre 1.91 et 7.21 dyn/cm^2 . Après les 3.5 jours de perfusion, la lectine est perfusée à la même concentration que pour l'expérience précédente, mais cette fois-ci durant 4 heures. L'empilement est ensuite rincé, extrait de la carte, fixé dans du PFA et placé au sein d'un gel OCT pour la découpe au cryomicrotome.

Pour cette expérience, des tranches d'épaisseur 10 μm ont pu être découpées. Sur ces découpes, la couche de cellules endothéliales se développant entre les microsphères présente des espaces poreux (Figure 6.20a, c & e) et n'est pas totalement homogène comme cela a pu être observé sur les découpes précédentes de 50 μm (Figure 6.18 & Figure 6.19). L'aspect de la couche de cellules inter-billes de la Figure 6.18 où l'empilement a été perfusé durant 3 jours au total présente une couche de cellules au niveau des espaces inter-billes à l'aspect différent. Des pores ne sont pas visibles comme cela est le cas Figure 6.20a, c & e. Il est alors possible que cette visualisation des pores soit rendue possible par la faible épaisseur des tranches de découpe.

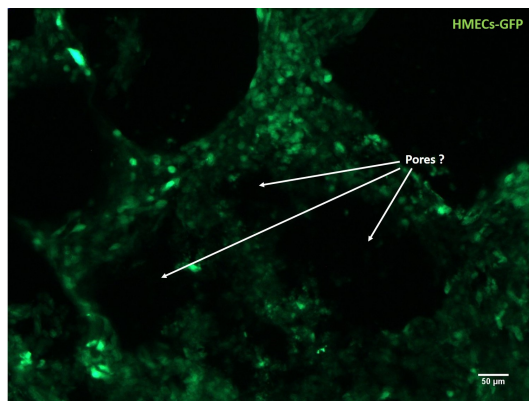
Des pores sont observés au sein de la couche de cellules endothéliales comblant l'espace



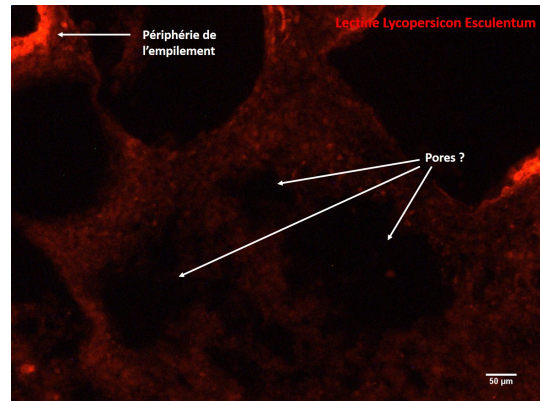
(a) Fluorescence de la GFP des HMECs.



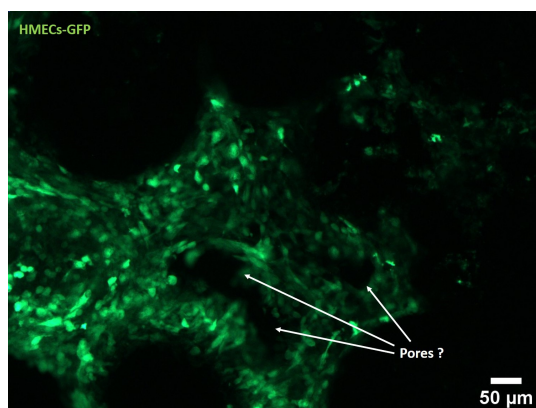
(b) Fluorescence de la lectine de l'image (a).



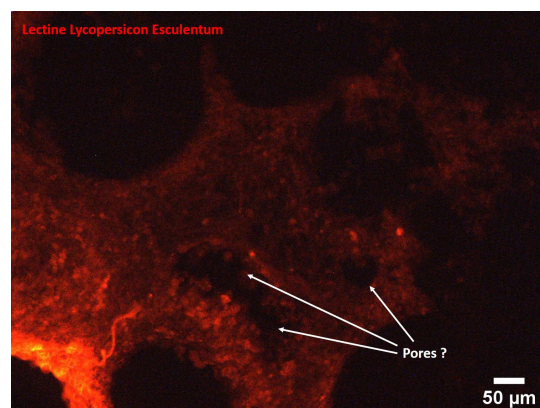
(c) Zoom sur un espace inter-capsules.



(d) Fluorescence de la lectine de l'image (c) - contraste réhaussé.



(e) Zoom sur un espace inter-sphères.



(f) Fluorescence de la lectine de l'image (e) - contraste réhaussé.

FIGURE 6.19 – 18h de perfusion à 0.2-0.74 dyn/cm² + 4 jours à 1.96-7.43 dyn/cm².

inter-capsules. Si l'on mesure la dimension des pores, on trouve des tailles de pores assez variables mais dont le diamètre coïncide ou est proche du diamètre des capillaires sanguins. L'observation de la fluorescence rouge permet de révéler l'accroche de la lectine sur les cellules endothéliales. La fluorescence rouge des images est beaucoup plus importante que sur les tranches de l'expérience présentée Figure 6.19, et le contraste n'a pas eu besoin d'être rehaussé sur ces images. En comparant respectivement les images de fluorescence rouge (Figure 6.20b, d & f) aux images de fluorescence verte (Figure 6.20a, c & e), il semble que la totalité des cellules de l'échantillon ait été en contact avec la lectine. Cela signifierait qu'aucun pore ne s'est bouché et que la totalité de l'empilement a été perfusée.

Certaines équipes démontrent la formation de capillaires sanguins en effectuant des sections transverses et un marquage des noyaux des cellules. Le but est d'observer des structures creuses entourées de cellules endothéliales visibles par leur noyau. Un marquage des noyaux est également effectué sur les tranches pré-découpées de l'expérience. Ce marquage des noyaux permet de détecter les cellules individuelles. On aperçoit ainsi la densité importante des cellules au sein des espaces inter-billes (Figure 6.21a & b). On s'aperçoit que la fluorescence verte des cellules endothéliales n'est plus aussi intense que sur la Figure 6.20. En effet, une semaine s'est écoulée entre la découpe et le marquage des noyaux ce qui a entraîné une détérioration de la fluorescence verte des cellules HMECs-GFP. En revanche le marquage des cellules s'avère efficace (Figure 6.21a). Si l'on observe plus précisément certaines zones inter-billes, on distingue bien des zones creuses dont la paroi est constituée de plusieurs cellules endothéliales (Figure 6.21b & c).

L'expérience a été renouvelée, au sein d'un empilement perfusé durant 6 jours à un cisaillement compris entre $1.97-7.47 \text{ dyn/cm}^2$, afin de vérifier la perfusabilité de l'empilement au bout de 6 jours de culture. Une perfusion de lectine et un marquage des noyaux ont également été réalisés, de la même manière que pour l'expérience précédente. Les images des tranches de $10 \mu\text{m}$ effectuées au cryomicrotome sont montrées Figure 6.22.

La couche de cellules endothéliales n'est pas homogène au niveau de l'espace entre plusieurs microsphères (Figure 6.22a). Des sections sphériques creuses sont à nouveau observées dans la couche de cellules endothéliales. En comparaison avec les expériences précédentes, il apparaît que ces pores sont détectés uniquement sur les tranches $10 \mu\text{m}$ d'épaisseurs. Les pores sont cependant moins bien marqués que pour l'expérience précédente : peu de couches vertes et bleues concomitantes sont discernées (Figure 6.22e-f & g-h). On distingue des différences dans l'aspect des pores (Figure 6.22c & d) : certains pores possèdent un périmètre bien délimité et fermé par les cellules endothéliales que l'on identifie comme des pores de capillaires. D'autres pores possèdent un périmètre mal délimité pouvant être soit des artefacts de découpe, soit des capillaires non-perpendiculaires au plan de découpe. Cependant, la faible intensité fluorescente du cœur comparée à la paroi de l'empilement semble indiquer que ces zones creuses n'ont pas été perfusées par la lectine (Figure 6.22b). La lectine est détectée uniquement au niveau de certaines zones locales (Figure 6.22f). La majorité du flux circule au niveau des parois du canal microfluidique.

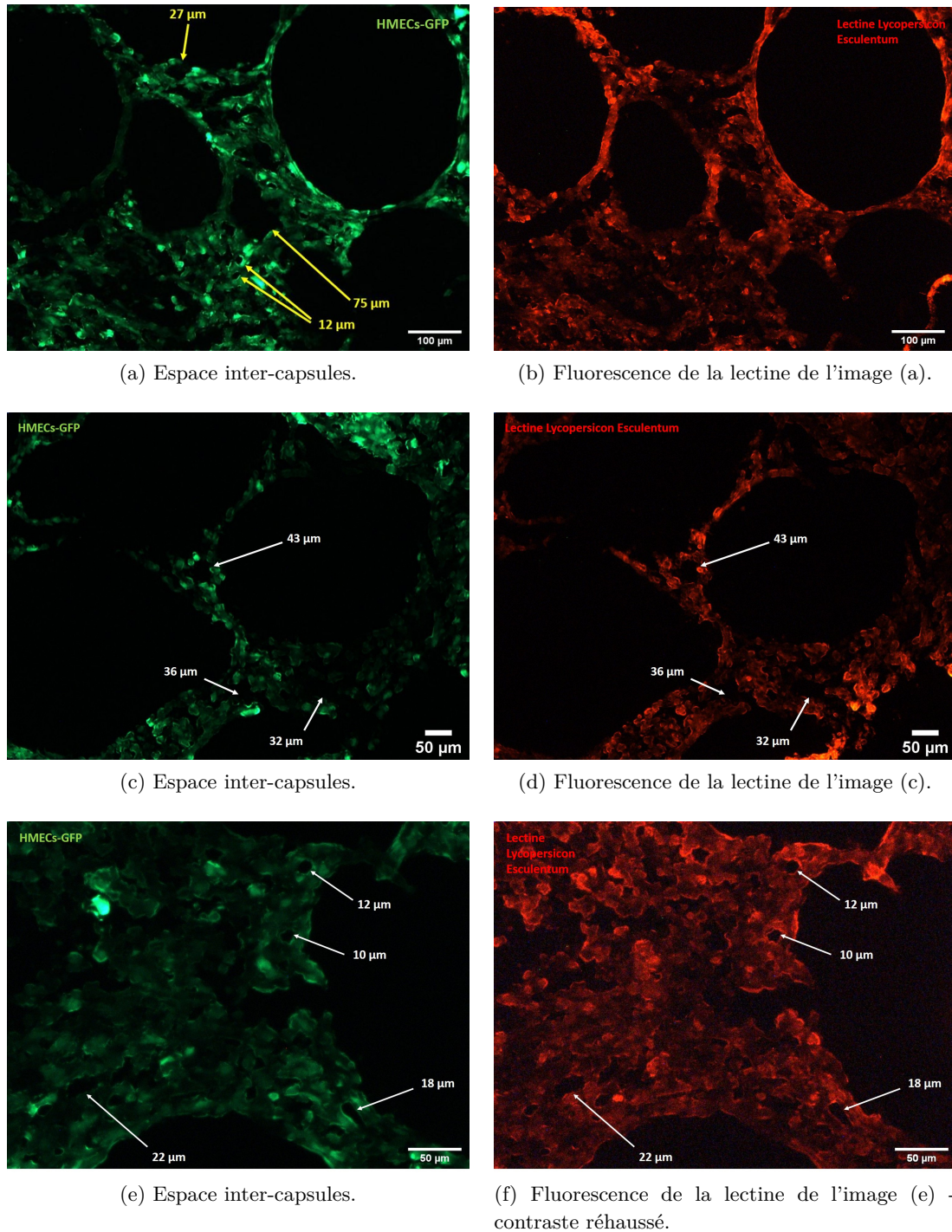
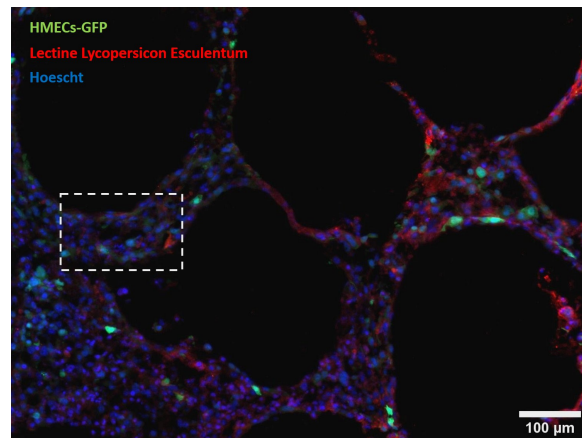
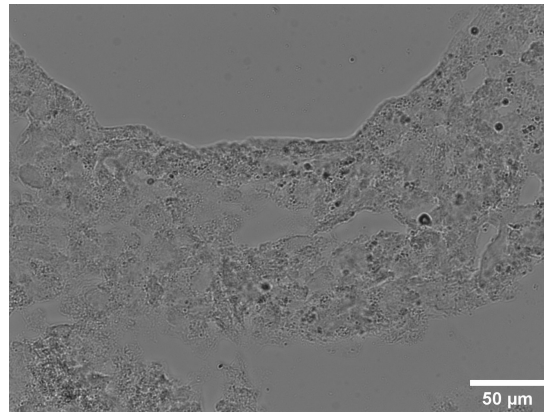


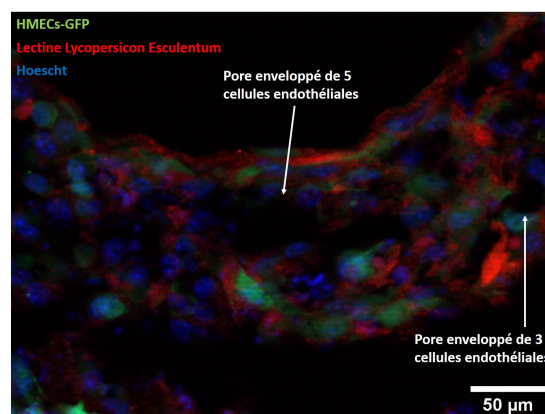
FIGURE 6.20 – 3.5 jours de perfusion à 1.91-7.21 dyn/cm^2 .



(a) Fluorescence des cellules endothéliales (vert), marquage de leur noyau (bleu) et adhésion de la lectine (rouge) pour les cellules en contact avec le flux.



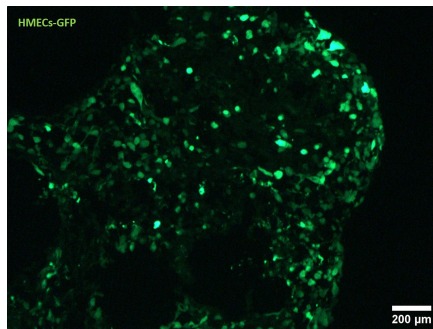
(b) Image en lumière blanche de la zone indiquée sur l'image (a).



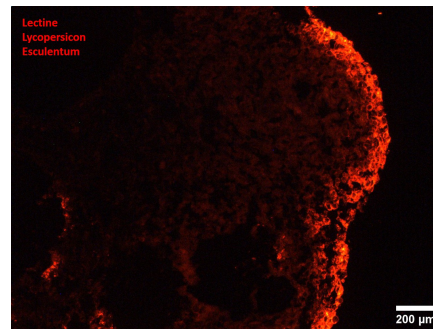
(c) Image fluorescente de la zone indiquée sur l'image (a).

FIGURE 6.21 – Section transverse d'épaisseur $10 \mu\text{m}$ de l'empilement perfusé durant 3 jours sous $1.91\text{-}7.21 \text{ dyn/cm}^2$.

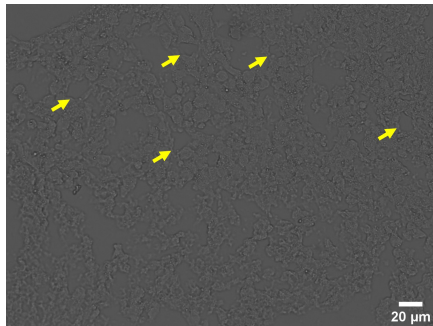
Il est difficile de conclure sur la perfusion à 6 jours à partir de cette expérience. Il semble que des pores sont présents au coeur de l'empilement mais n'ont pas été perfusés par la lectine au bout du 6^{ème} jour. Des expériences complémentaires doivent être menées afin de déterminer si le système est perfusable ou si des bouchons se sont formés et, en auquel cas, déterminer le temps à partir duquel l'empilement n'est plus perfusé. Cette densité cellulaire au sein de l'empilement est une preuve du bon environnement fourni aux cellules qui prolifèrent activement. Néanmoins, le développement au sein des vides entre les sphères soulève un questionnement : les cellules utilisées sont des cellules MECs-GFP issues d'une lignée cellulaire. Ces cellules ne semblent pas démontrer d'inhibitions de contact ce qui entraîne un envahissement constant des "vides" de notre empilement. Il serait intéressant d'effectuer ces mêmes expériences à partir de cellules endothéliales primaires dont le phénotype est plus proche de celui rencontré *in vivo*. Le développement des cellules pourrait être combiné avec une encapsulation de péricytes afin de stabiliser les vaisseaux formés et rendre mature le réseau.



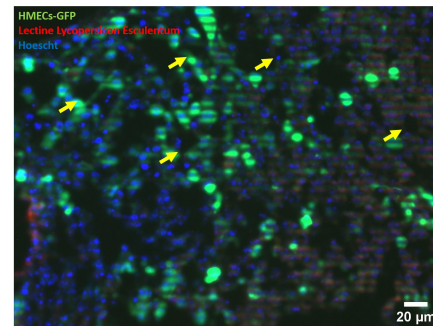
(a) Espace entre les sphères.



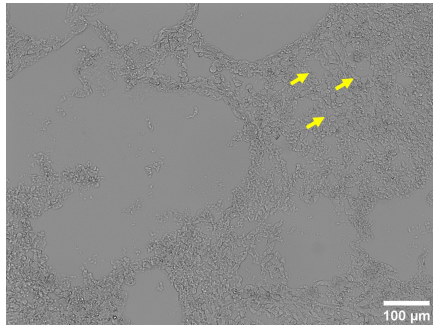
(b) Fluorescence de la lectine de l'image (a).



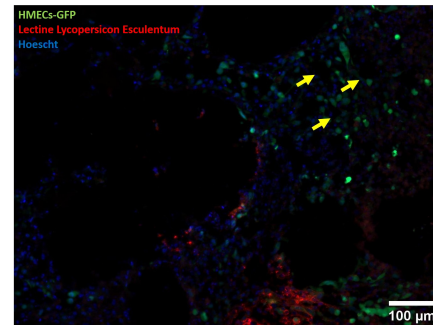
(c) Lumière blanche.



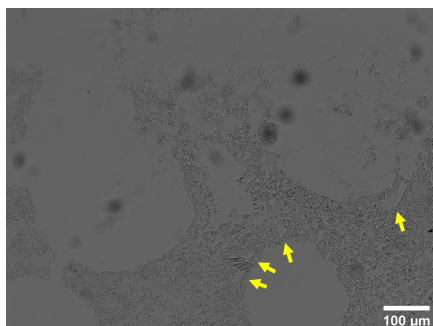
(d) Fluorescence de l'image (c).



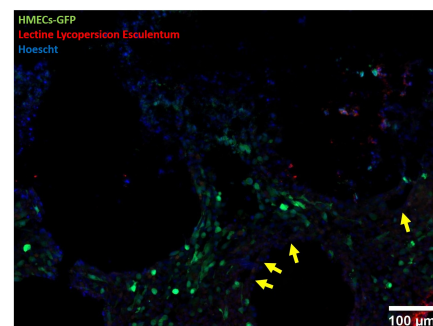
(e) Lumière blanche.



(f) Fluorescence de l'image (e)



(g) Lumière blanche.



(h) Fluorescence de l'image (g).

FIGURE 6.22 – 6 jours de perfusion à $1.97-7.47 \text{ dyn/cm}^2$.
Les flèches indiquent quelques pores intègres.

Conclusion

Bilan des expériences

Le système poreux est composé d'empilements de microsphères formées par le procédé Centricaps. Dans ce chapitre, il a été montré que les cellules endothéliales s'étalent et se développent sur un gel de collagène alors qu'elles ne présentent aucun site d'accroche avec l'alginate sur lequel elles forment des amas de cellules. L'utilisation d'un mélange d'alginate et de collagène permet de bénéficier de la rigidité de l'alginate et de l'affinité des cellules pour le collagène. Nous avons ainsi démontré l'accroche de cellules endothéliales à la surface des microsphères et leur développement en surface recouvrant la paroi. Ces expériences ont été faites sur plusieurs mélanges d'alginate et de collagène et un biopolymère optimal a été défini : SLM2-Col3. Le taux de recouvrement des microsphères était néanmoins variable sur plusieurs expériences reproduites à l'identique et l'ajout d'une étape de recouvrement des microsphères par une fine couche de collagène a permis d'améliorer l'efficacité et la reproductibilité du protocole de recouvrement des microsphères par des cellules endothéliales.

L'empilement formé par les microsphères recouvertes de cellules endothéliales offre un environnement de culture perfusée qui semble très favorable aux cellules endothéliales, étant donné leur forte prolifération au sein du milieu. Le circuit de perfusion développé est stérile car aucune contamination n'a été observée et la carte microfluidique a été modifiée afin de permettre une extraction du tissu en fin d'expérience. De nombreuses zones d'alignements des cellules endothéliales sont observées au sein de l'empilement, signe que l'écoulement imposé génère un cisaillement physiologique sur les cellules.

Concernant la formation du réseau capillaire au niveau de l'espace interstitiel de l'empilement, des pores de dimensions comprises entre 10 et 100 μm , enveloppés de cellules endothéliales, sont observés au sein de l'espace interbilles. La structure des capillaires est retrouvée mais d'autres paramètres, comme la perméabilité de l'endothélium, doivent être mesurés afin d'affirmer le développement d'un réseau de capillaires. L'empilement endothélialisé est toujours perfusable après 3.5 jours de perfusion continue et des pores sont encore visibles après 6 jours de perfusion.

Perspectives

Le coeur de l'empilement ne semble plus perfusé après 5 jours de culture. Le tissu construit est épais (3mm x 2mm x 1cm), les cellules du coeur de l'empilement ne peuvent donc être approvisionnées que par les pores interstitiels de l'empilement des microsphères dans lequel le réseau se développe. Ainsi, des mesures de viabilité effectuées à différents jours de perfusions, pourraient permettre d'observer l'état des cellules au coeur de l'empilement et d'affirmer ou d'infirmer l'écoulement du fluide au niveau des espaces interstitiels après plusieurs jours de perfusion. Cependant, on peut penser que les cellules sont toujours vivantes car la fluorescence des cellules endothéliales est toujours détectée.

Afin de vérifier l'impact du flux et du cisaillement sur la perfusabilité de l'empilement, une expérience comparative doit également être effectuée entre un empilement perfusé durant plusieurs jours à un cisaillement de 1 à 10 dyn/cm², et un empilement perfusé durant plusieurs jours sous un flux très faible imposant un cisaillement négligeable. Cette expérience doit être effectuée dans les mêmes conditions, avec les mêmes cellules et les mêmes produits afin que la seule condition variable entre les deux expériences soit l'application de l'écoulement. Ces expériences devront également être réalisées plusieurs fois afin de comparer l'évolution au bout de 3 jours, 4 jours et plus. L'analyse de sections longitudinales de l'empilement devrait également être effectuée afin d'observer un alignement des cellules au niveau du coeur de la construction tissulaire, sur un champ large de l'empilement et ainsi confirmer le bon paramétrage de l'écoulement.

Nous souhaitons démontrer la possibilité de former un réseau de capillaires sanguins aux dimensions adaptables au sein d'une construction tissulaire épaisse. De par les propriétés des milieux poreux formés par les empilements de sphères, la construction présente un réseau de canaux recouvert de cellules endothéliales au moment de l'injection. L'écoulement imposé influence l'alignement des cellules endothéliales le long des lignes de courant. Dans ces conditions, les cellules endothéliales s'auto-organisent pour former un réseau de capillaire. Il apparaît que les cellules endothéliales prolifèrent fortement et peuvent boucher l'espace interstitiel et bouchent les pores après plusieurs jours de perfusion. Or ces expériences ont été réalisées à partir de la lignée cellulaire HMECs-GFP. Il serait intéressant de réaliser les mêmes expériences avec des cellules primaires dont le phénotype serait plus proche de celui *in vivo*. Une co-culture avec des péricytes intégrés par encapsulation au sein des microsphères pourrait également stabiliser le réseau endothélialisé en formation et inhiber la prolifération des cellules endothéliales.

Chapitre 7

Conclusion

L'objectif de cette thèse était de développer un tissu épais vascularisé en cartouche microfluidique ayant des applications d'ingénierie tissulaire et d'organes-sur-puces. Une technique de vascularisation par assemblage modulaire a été employée. Par rapport aux autres techniques développées dans la littérature, l'assemblage modulaire permet le développement rapide d'une vascularisation au sein de constructions tissulaires épaisses directement perfusables. Afin de recréer un tissu, des cellules du tissu d'intérêt peuvent être encapsulées au sein des micro-environnements tissulaires et sont directement alimentées par l'écoulement circulant au sein de l'empilement. Ainsi, notre stratégie promet le développement d'un tissu ou organes épais par assemblage rapide des 3 composants principaux des tissus biologiques : la matrice extracellulaire, les cellules et le réseau vasculaire. L'ajustement de la dimension des modules à la limite de diffusion de l'oxygène assure un approvisionnement continu de la totalité des cellules incluses dans la construction. De plus, la géométrie des tubes endothélialisés est ajustable par adaptation de la dimension des microsphères. Le diamètre caractéristique des pores créés peut être ajusté à la dimension des capillaires *in vivo* et offre une meilleure résolution que les autres techniques de vascularisation de tissus épais : les techniques de recouvrement de parois et la bioimpression.

Notre technique repose sur l'empilement de micro-environnements formant une macrostructure tissulaire poreuse perfusable en carte microfluidique. Les modules utilisés sont des microsphères de biopolymères représentatifs de la matrice extracellulaire des tissus. La surface des microsphères est recouverte préalablement de cellules endothéliales et un écoulement physiologique contrôlé est appliqué au sein de la structure poreuse favorisant l'auto-assemblage des cellules en capillaires sanguins. Les modules sphériques permettent un contrôle des dimensions des pores de l'empilement et des forces générées par l'écoulement.

Dans le cadre de cette étude, un dispositif de production de microsphères à partir d'hydrogels a été fabriqué et optimisé. Ce dispositif a permis la production répétée de microsphères constituées de biomatériaux représentatifs de la matrice extracellulaire des tissus biologiques. Un biomatériau favorisant l'accroche et le développement des cellules

endothéliales a été identifié et un protocole de recouvrement homogène des microsphères par les cellules a été établi. L'accroche et le recouvrement des microsphères se sont révélés plus efficaces pour un mélange d'alginate à 2% et de collagène à 3 mg/mL. Des variations, inhérentes aux applications de biologie cellulaire, ont été observées concernant le recouvrement des microsphères sur différentes expériences. Un recouvrement post-production des microsphères avec du collagène a montré une nette amélioration du recouvrement.

Une étude théorique de la structure formée par les empilements de sphères a été menée. Cette étude a permis de déterminer la taille des microsphères à empiler afin de former un milieu poreux dont la taille caractéristique des pores se rapproche de celles des capillaires *in vivo*. Des calculs théoriques ont permis d'établir une relation liant le débit à appliquer afin d'induire un cisaillement physiologique à la surface des parois de l'empilement, recouverte de cellules endothéliales. Des cartes microfluidiques ont été fabriquées afin de former la structure d'empilement de sphères. Ces cartes intègrent une chambre de formation de l'empilement suivie d'un filtre de rétention des microsphères. Plusieurs géométries de chambres et plusieurs méthodes de rétention des microsphères ont été testées et ont permis de développer une architecture microfluidique simple de formation de l'empilement. Cette chambre permet la formation d'empilement de sphères de plusieurs millimètres cube. Les écoulements au sein des empilements formés ont été caractérisés par des mesures de μ PIV et ont validé le modèle théorique des écoulements préalablement établi. Ces caractérisations ont permis le contrôle des forces de cisaillement imposées au niveau des parois de l'empilement en fonction du débit appliqué. Un circuit microfluidique stérile de perfusion a été conçu pour la culture des cellules. Des empilements de sphères endothélialisées ont été formés et ont été cultivés sous perfusion, en imposant un cisaillement physiologique, durant plus de 6 jours. Les cellules ont montré un fort développement et une réorganisation au sein de la structure. Des couches homogènes de cellules se sont développées en formant des ponts cellulaires entre les microsphères. Les cellules ont également montré une orientation dans la direction de l'écoulement. Des modifications ont ensuite été effectuées sur la carte microfluidique afin de permettre l'extraction de la construction tissulaire épaisse développée et la manipulation externe du tissu. Des caractérisations du tissu ont été effectuées par analyse de section transverse à l'écoulement. Ces caractérisations ont révélé la présence de nombreux pores creux endothélialisés dont les dimensions correspondent à celles des capillaires sanguins *in vivo*. Ces pores pourraient indiquer la présence d'un réseau de capillaire au sein de l'espace interstitiel de l'empilement de sphères. La perfusion de ces pores a été montrée à plus de 3 jours, mais n'a cependant pas été identifiée au-delà.

A l'issue de ces travaux, il a été montré que les cellules étaient viables et proliféraient au sein de l'échafaudage construit par empilement des microsphères. L'auto-assemblage des cellules endothéliales a été observé. La perfusion des pores a été montrée à plus de 3 jours avec la présence de tubes creux endothélialisés de diamètre équivalent compris entre quelques microns jusqu'à une centaine de microns. Cette structure est caractéristique de la morphologie des capillaires *in vivo*.

Néanmoins, plusieurs critères doivent encore être démontrés afin de valider la forma-

tion d'un réseau de capillaire sanguin. Une des propriétés essentielles des capillaires est la fonction de membrane sélective perméable qui filtre les composés du sang. La perméabilité des couches de cellules endothéliales devra alors être évaluée. De plus, la maturité des vaisseaux doit être étudiée afin de vérifier que les vaisseaux sont toujours perfusable après une semaine de culture. Il est également nécessaire d'évaluer l'impact de l'utilisation de cellules de lignées par rapport à des cellules primaires sur la maturité des vaisseaux. Les péricytes sont des cellules présentes à la surface des capillaires et des petites veinules, possédant une morphologie allongée avec de longues extensions cytoplasmiques qui enveloppent l'endothélium. Elles forment une couche discontinue qui est éventuellement remplacée par une couche continue de cellules de muscles lisses (SMCs pour Smooth Muscle Cells) lorsque les capillaires convergent vers des plus gros vaisseaux sanguins. Les péricytes jouent un rôle dans la vasoconstriction et vasodilatation des capillaires ainsi que dans la maturation des capillaires. Ainsi, il serait intéressant d'inclure des péricytes au sein des microsphères recouvertes de collagène afin de reproduire la structure hiérarchique des capillaires *in vivo*. Cette inclusion pourrait permettre de stabiliser le développement des capillaires et les rendre mature. L'encapsulation de cellules de tissus au sein des microsphères doit également être testée car les signaux paracrinaux sécrétés pourraient influencer le développement du réseau capillaire. Enfin, il serait intéressant d'améliorer le dispositif de rétention des microsphères afin d'analyser l'impact d'un cisaillement plus important sur les cellules.

Perspectives

L'avantage principal de cette technique pour la construction de tissus épais réside dans ses possibilités d'adaptation et le fait que le système implémente de nombreuses caractéristiques de l'environnement *in vivo*. Bien que de nombreuses caractérisations soient encore nécessaires sur notre dispositif, ces travaux montrent la possibilité de former des tissus épais vascularisés par application de notre technique. Le potentiel applicatif est large.

Tout d'abord, des améliorations des dispositifs d'observations sont essentielles au suivi de l'évolution des cellules au sein de la structure. Un projet de développement d'un système optique, de type feuillet de lumière *in situ*, permettant l'observation du cœur de la structure durant la perfusion, est actuellement en développement au sein du laboratoire.

Concernant le développement de tissus épais, des cellules peuvent être encapsulées au sein des microsphères. Les interactions entre les cellules et la matrice extracellulaire sont reproduites par l'encapsulation des cellules typiques de l'organe d'intérêt au sein d'un biopolymère, et la culture des cellules endothéliales sur la surface du biopolymère. Plusieurs biopolymères peuvent être utilisés pour produire les microsphères et adaptés selon l'affinité avec les cellules encapsulées. De même, les interactions entre les cellules vasculaires et les cellules parenchymateuses sont reproduites. Plusieurs types de cellules peuvent être encapsulées au sein des mêmes sphères, ou bien deux types de sphères (ou plus) peuvent être produites séparément et empilées ensemble, créant ainsi des cocultures. La technique d'encapsulation étant compatible avec de nombreux biopolymères, la composition des mi-

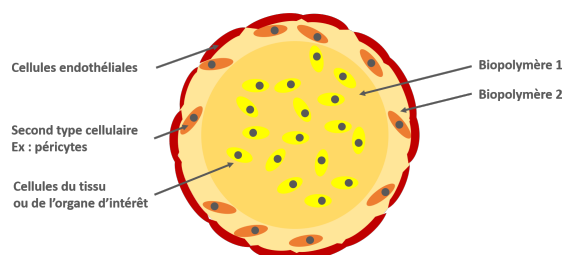


FIGURE 7.1 – Schéma d'une double-encapsulation.

croosphères peut être ajustée à la cellule cultivée. L'architecture des tissus peut ainsi être reproduites en alternant les couches d'empilement de microsphères.

Les techniques d'encapsulation permettent également d'améliorer notre technique. Il est par exemple possible de produire des sphères avec différentes couches de biopolymères afin de créer des microbilles stratifiées. Ainsi, on peut par exemple imaginer produire un cœur à l'aide d'un biopolymère contenant un ou plusieurs types de cellules du tissu ou de l'organe que l'on souhaite mimer, puis former une seconde couche extérieure contenant un nouveau type cellulaire et enfin recouvrir l'ensemble de cellules endothéliales (Figure 7.1). Cette technique, dite de double-encapsulation, permettrait de compartimentaliser les cellules au sein d'une même microsphère afin de recréer au mieux l'architecture d'un tissu. Par exemple, l'encapsulation de péricytes au sein de la seconde couche externe permet de reproduire la structure des capillaires : sang – endothélium – lame basale contenant des péricytes (Figure 2.1). Il est également possible de produire d'autres couches supplémentaires mais cela complexifie la technique de production et il devient plus difficile d'obtenir un rayon de bille final inférieur à $200\ \mu\text{m}$.

Une autre possibilité d'amélioration réside dans l'utilisation de biomatériaux résorbables. La matrice extracellulaire est un environnement dynamique : certaines cellules la dégradent quand d'autres la renouvellent en sécrétant leur propre matrice extracellulaire. Il est donc envisageable d'utiliser des biomatériaux résorbables encapsulant des cellules sécrétrices de MEC afin qu'à terme ce microenvironnement s'auto-arrange en sécrétant ses propres échafaudages. L'utilisation de microsphères offre ainsi de nombreuses possibilités de structuration afin de mimer un environnement *in vivo*. La composition des microsphères est donc variable et doit être adaptée selon le type cellulaire d'études et l'utilisation finale du tissu ou organe construit.

La dimension des vaisseaux formée peut également être contrôlée afin de mimer au mieux les paramètres *in vivo*. La taille moyenne des pores de l'empilement diminue avec les dimensions des microsphères selon une formule présentée précédemment. Ce contrôle de l'espace inter-billes des empilements aléatoires offre des possibilités de structuration. Différentes couches de sphères de même taille peuvent être empilées. Il est alors envisageable, par exemple, de créer un empilement de microsphères formant des pores de section large, puis un empilement de microsphères à section étroite afin de mimer la structure d'une

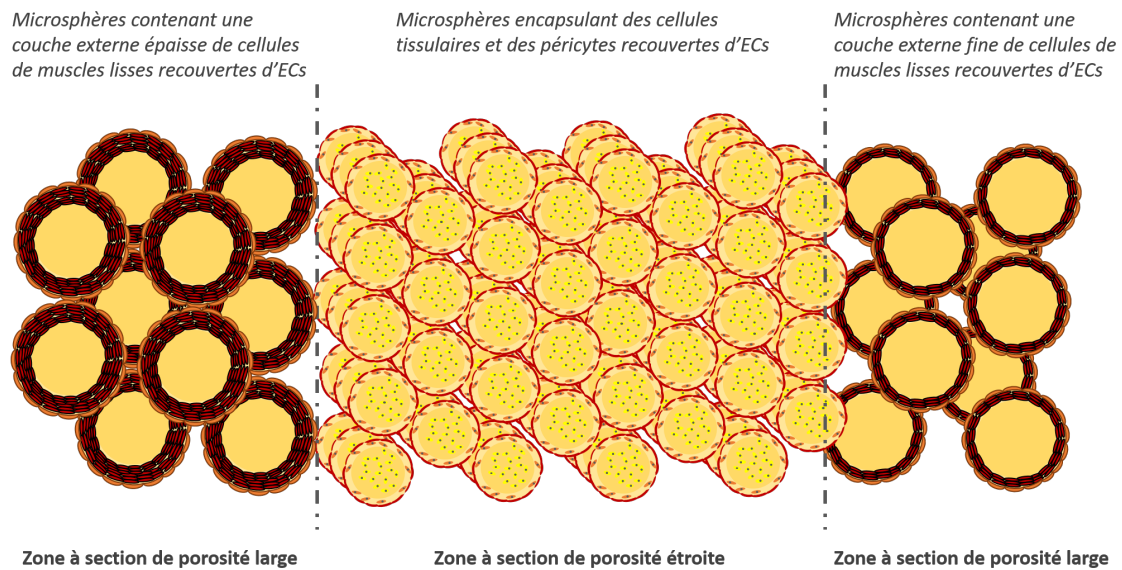


FIGURE 7.2 – Exemple d’utilisation des microbilles de différents diamètres : idée d’empilement permettant de reproduire les dimensions des artérioles se subdivisant en capillaires et se ramifiant en veinules.

artériole se subdivisant en des capillaires fins et se ramifiant en veinules (Figure 7.2). En dimensionnant le canal de perfusion avec les dimensions d’une artère, il est possible de recréer le schéma artère – artérioles – capillaires – veinules – veines.

Pour des applications d’organes-sur-puces, il est possible de modifier l’architecture des chambres microfluidiques de perfusion selon le modèle. Il faut cependant veiller à caractériser l’écoulement afin de contrôler le cisaillement imposé. Des chambres en forme de diamant, par exemple, sont généralement utilisées dans la littérature afin de mimer la structure du réseau sanguin au niveau de la subdivision des artères en artérioles puis capillaires et de leur ramification en veinules, puis veines. Ces architectures présentent l’avantage de favoriser l’anastomose du réseau de capillaires avec des canaux plus larges.

Il est également possible d’imaginer une version “corps-sur-puce” pour notre système. De nombreux laboratoires cherchent à brancher différents organes-sur-puce entre eux afin de reproduire les interactions entre organes. Un schéma d’un modèle d’organes-sur-puces utilisant notre technique est schématisé ci-dessous (Figure 7.3). Chaque chambre encapsulerait des cellules d’organes différents. Des vannes permettraient de perfuser chacune des chambres individuellement afin de développer le réseau microvasculaire au sein des espaces interstitiels. Une fois les réseaux sanguins développés dans chaque chambre et l’anastomose effectuée, des vannes permettraient de perfuser l’ensemble grâce à un canal microfluidique mimant le chemin artère-organes-veines parcouru par le sang. On pourrait alors perfuser en simultanée un système composé de plusieurs modèles d’organes en parallèles.

Références

- [1] Didier Letourneur and Laurence Bordenave. Ingénierie tissulaire : Une approche multidisciplinaire. *médecine/sciences*, 33(1) :46–51, January 2017.
- [2] T. Shin’oka, Y. Imai, and Y. Ikada. Transplantation of a tissue-engineered pulmonary artery. *The New England Journal of Medicine*, 344(7) :532–533, February 2001.
- [3] J Vacanti. Tissue and organ engineering : can we build intestine and vital organs ? *Journal of Gastrointestinal Surgery*, 7(7) :831–835, November 2003.
- [4] Joseph A. DiMasi, Henry G. Grabowski, and Ronald W. Hansen. Innovation in the pharmaceutical industry : New estimates of R&D costs. *Journal of Health Economics*, 47 :20–33, May 2016.
- [5] Jack W. Scannell, Alex Blanckley, Helen Boldon, and Brian Warrington. Diagnosing the decline in pharmaceutical R&D efficiency. *Nature Reviews Drug Discovery*, 11(3) :191–200, March 2012.
- [6] David D. Allen, Raúl Caviedes, Ana María Cárdenas, Takeshi Shimahara, Juan Segura-Aguilar, and Pablo A. Caviedes. Cell Lines as In Vitro Models for Drug Screening and Toxicity Studies. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 31(8) :757–768, January 2005.
- [7] Anna Astashkina, Brenda Mann, and David W. Grainger. A critical evaluation of in vitro cell culture models for high-throughput drug screening and toxicity. *Pharmacology & Therapeutics*, 134(1) :82–106, April 2012.
- [8] James Butler, Bart Hens, Maria Vertzoni, Joachim Brouwers, Philippe Berben, Jennifer Dressman, Cord J. Andreas, Kerstin Julia Schaefer, James Mann, Mark McAllister, Masoud Jamei, Edmund Kostewicz, Filippos Kesisoglou, Peter Langguth, Mans Minekus, Anette Müllertz, Ronald Schilderink, Mirko Koziolk, Philipp Jedamzik, Werner Weitschies, Christos Reppas, and Patrick Augustijns. In vitro models for the prediction of in vivo performance of oral dosage forms : Recent progress from partnership through the IMI OrBiTo collaboration. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 136 :70–83, March 2019.
- [9] Steven M. Paul, Daniel S. Mytelka, Christopher T. Dunwiddie, Charles C. Persinger, Bernard H. Munos, Stacy R. Lindborg, and Aaron L. Schacht. How to improve R&D

- productivity : the pharmaceutical industry's grand challenge. *Nature Reviews Drug Discovery*, 9(3) :203–214, March 2010.
- [10] Kacey Ronaldson-Bouchard and Gordana Vunjak-Novakovic. Organs-on-a-Chip : A Fast Track for Engineered Human Tissues in Drug Development. *Cell Stem Cell*, 22(3) :310–324, March 2018.
- [11] Samad Ahadian, Robert Civitarese, Dawn Bannerman, Mohammad Hossein Mohammadi, Rick Lu, Erika Wang, Locke Davenport-Huyer, Ben Lai, Boyang Zhang, Yimu Zhao, Serena Mandla, Anastasia Korolj, and Milica Radisic. Organ-On-A-Chip Platforms : A Convergence of Advanced Materials, Cells, and Microscale Technologies. *Advanced Healthcare Materials*, 7(2) :1700506, January 2018.
- [12] Esther C. Novosel, Claudia Kleinhans, and Petra J. Kluger. Vascularization is the key challenge in tissue engineering. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 63(4-5) :300–311, April 2011.
- [13] Fred T Bosman and Ivan Stamenkovic. Functional structure and composition of the extracellular matrix : Structure and composition of the extracellular matrix. *The Journal of Pathology*, 200(4) :423–428, July 2003.
- [14] C. Frantz, K. M. Stewart, and V. M. Weaver. The extracellular matrix at a glance. *Journal of Cell Science*, 123(24) :4195–4200, December 2010.
- [15] Liliana Schaefer and Roland M. Schaefer. Proteoglycans : from structural compounds to signaling molecules. *Cell and Tissue Research*, 339(1) :237, June 2009.
- [16] Hannu Järveläinen, Annele Sainio, Markku Koulu, Thomas N. Wight, and Risto Penttinen. Extracellular Matrix Molecules : Potential Targets in Pharmacotherapy. *Pharmacological Reviews*, 61(2) :198–223, June 2009.
- [17] Vinay Kumar, Abul K. Abbas, and Jon C. Aster. *Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease E-Book*. Elsevier Health Sciences, September 2014. Google-Books-ID : 5NbsAwAAQBAJ.
- [18] Tania Rozario and Douglas W. DeSimone. The extracellular matrix in development and morphogenesis : A dynamic view. *Developmental Biology*, 341(1) :126–140, May 2010.
- [19] Locke Davenport Huyer, Miles Montgomery, Yimu Zhao, Yun Xiao, Genevieve Conant, Anastasia Korolj, and Milica Radisic. Biomaterial based cardiac tissue engineering and its applications. *Biomedical Materials*, 10(3) :034004, May 2015.
- [20] Veronica Iacovacci, Leonardo Ricotti, Arianna Menciassi, and Paolo Dario. The bioartificial pancreas (BAP) : Biological, chemical and engineering challenges. *Biochemical Pharmacology*, 100 :12–27, January 2016.
- [21] Linda G. Griffith and Melody A. Swartz. Capturing complex 3d tissue physiology in vitro. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7(3) :211–224, March 2006.
- [22] Majid Jamshidian, Elmira Arab Tehrany, Muhammad Imran, Muriel Jacquot, and Stéphane Desobry. Poly-Lactic Acid : Production, Applications, Nanocomposites,

- and Release Studies. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9(5) :552–571, August 2010.
- [23] Derick C Miller, Anil Thapa, Karen M Haberstroh, and Thomas J Webster. Endothelial and vascular smooth muscle cell function on poly(lactic-co-glycolic acid) with nano-structured surface features. *Biomaterials*, 25(1) :53–61, January 2004.
- [24] Richard T. Tran, Paul Thevenot, Dipendra Gyawali, Jung-Chih Chiao, Liping Tang, and Jian Yang. Synthesis and characterization of a biodegradable elastomer featuring a dual crosslinking mechanism. *Soft Matter*, 6(11) :2449, 2010.
- [25] S. Van Vlierberghe, P. Dubruel, and E. Schacht. Biopolymer-Based Hydrogels As Scaffolds for Tissue Engineering Applications : A Review. *Biomacromolecules*, 12(5) :1387–1408, May 2011.
- [26] Seung Hwan Lee, Kyu Young Shim, Bumsang Kim, and Jong Hwan Sung. Hydrogel-based three-dimensional cell culture for organ-on-a-chip applications. *Biotechnology Progress*, 33(3) :580–589, May 2017.
- [27] Sung-Bin Park, Eugene Lih, Kwang-Sook Park, Yoon Ki Joung, and Dong Keun Han. Biopolymer-based functional composites for medical applications. *Progress in Polymer Science*, 68 :77–105, May 2017.
- [28] Xiaoming Li, Rongrong Cui, Lianwen Sun, Katerina E. Aifantis, Yubo Fan, Qingling Feng, Fuzhai Cui, and Fumio Watari. 3d-Printed Biopolymers for Tissue Engineering Application. *International Journal of Polymer Science*, 2014 :1–13, 2014.
- [29] H. Wolinsky. A proposal linking clearance of circulating lipoproteins to tissue metabolic activity as a basis for understanding atherogenesis. *Circulation Research*, 47(3) :301–311, September 1980.
- [30] W. C. Aird. Spatial and temporal dynamics of the endothelium. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*, 3(7) :1392–1406, July 2005.
- [31] Judah Folkman and Mark Hochberg. SELF-REGULATION OF GROWTH IN THREE DIMENSIONS. *The Journal of Experimental Medicine*, 138(4) :745–753, October 1973.
- [32] Khashayar Moshksayan, Navid Kashaninejad, Majid Ebrahimi Warkiani, John G. Lock, Hajar Moghadas, Bahar Firoozabadi, Mohammad Said Saidi, and Nam-Trung Nguyen. Spheroids-on-a-chip : Recent advances and design considerations in microfluidic platforms for spheroid formation and culture. *Sensors and Actuators B : Chemical*, 263 :151–176, June 2018.
- [33] Shyh-Jou Shieh and Joseph P. Vacanti. State-of-the-art tissue engineering : From tissue engineering to organ building. *Surgery*, 137(1) :1–7, January 2005.
- [34] Hyun-wook Kang, Sang Jin Lee, In Kap Ko, Carlos Kengla, James J. Yoo, and Anthony Atala. A 3d bioprinting system to produce human-scale tissue constructs with structural integrity. *Nature Biotechnology*, 34 :312–319, 2016.
- [35] S. Blausen. com staff" Medical gallery of Blausen Medical 2014. *WikiJournal of Medicine*, 1(2) :10, 2014.

- [36] Hellmut G. Augustin and Gou Young Koh. Organotypic vasculature : From descriptive heterogeneity to functional pathophysiology. *Science (New York, N.Y.)*, 357(6353), 2017.
- [37] Daniel J. Nolan, Michael Ginsberg, Edo Israely, Brisa Palikuqi, Michael G. Poulos, Daylon James, Bi-Sen Ding, William Schachterle, Ying Liu, Zev Rosenwaks, Jason M. Butler, Jenny Xiang, Arash Rafii, Koji Shido, Sina Y. Rabbany, Olivier Elemento, and Shahin Rafii. Molecular Signatures of Tissue-Specific Microvascular Endothelial Cell Heterogeneity in Organ Maintenance and Regeneration. *Developmental cell*, 26(2), July 2013.
- [38] William C. Aird. Phenotypic heterogeneity of the endothelium : I. Structure, function, and mechanisms. *Circulation Research*, 100(2) :158–173, February 2007.
- [39] William C. Aird. Phenotypic heterogeneity of the endothelium : II. Representative vascular beds. *Circulation Research*, 100(2) :174–190, February 2007.
- [40] Hao Chang, Xi-Qiu Liu, Mi Hu, He Zhang, Bochao Li, Kefeng Ren, Thomas Boudou, Corinne Albiges-Rizo, Catherine Picart, and Jian Ji. Substrate Stiffness Combined with Hepatocyte Growth Factor Modulates Endothelial Cell Behavior. *Biomacromolecules*, 17, July 2016.
- [41] Judah Folkman and Christian Haudenschild. Angiogenesis in vitro. *Nature*, 288(5791) :551, December 1980.
- [42] E Young. Advances in Microfluidic Cell Culture Systems for Studying Angiogenesis. *Journal of laboratory automation*, 18, July 2013.
- [43] Keith H.K. Wong, Juliana M. Chan, Roger D. Kamm, and Joe Tien. Microfluidic Models of Vascular Functions. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 14(1) :205–230, 2012.
- [44] Hyunjae Lee, Minhwan Chung, and Noo Li Jeon. Microvasculature : An essential component for organ-on-chip systems. *MRS Bulletin*, 39(1) :51–59, January 2014.
- [45] Anwarul Hasan, Arghya Paul, Nihal E. Vrana, Xin Zhao, Adnan Memic, Yu-Shik Hwang, Mehmet R. Dokmeci, and Ali Khademhosseini. Microfluidic techniques for development of 3d vascularized tissue. *Biomaterials*, 35(26) :7308–7325, August 2014.
- [46] Alisa Morss Clyne, Swathi Swaminathan, and Andrés Díaz Lantada. Biofabrication strategies for creating microvascular complexity. *Biofabrication*, 11(3) :032001, April 2019.
- [47] Somin Lee, Jihoon Ko, Dohyun Park, Seung-Ryeol Lee, Minhwan Chung, Younggyun Lee, and Noo Li Jeon. Microfluidic-based vascularized microphysiological systems. *Lab on a Chip*, 18(18) :2686–2709, September 2018.
- [48] Seunggyu Kim, Wanho Kim, Seongjin Lim, and Jessie Jeon. Vasculature-On-A-Chip for In Vitro Disease Models. *Bioengineering*, 4(4) :8, January 2017.

-
- [49] Jillian W. Andrejcsk and Christopher C. W. Hughes. Engineering perfused microvascular networks into microphysiological systems platforms. *Current Opinion in Biomedical Engineering*, 5 :74–81, March 2018.
- [50] Max I. Bogorad, Jackson DeStefano, Johan Karlsson, Andrew D. Wong, Sharon Gerecht, and Peter C. Searson. Review : in vitro microvessel models. *Lab on a Chip*, 15(22) :4242–4255, 2015.
- [51] Sybill Patan. Vasculogenesis and angiogenesis. *Cancer Treatment and Research*, 117 :3–32, 2004.
- [52] O. M. Tepper. Adult vasculogenesis occurs through in situ recruitment, proliferation, and tubulization of circulating bone marrow-derived cells. *Blood*, 105(3) :1068–1077, September 2004.
- [53] Shane P. Herbert and Didier Y. R. Stainier. Molecular control of endothelial cell behaviour during blood vessel morphogenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 12(9) :551–564, September 2011.
- [54] Paul McLoughlin and Michael P. Keane. Physiological and Pathological Angiogenesis in the Adult Pulmonary Circulation. In *Comprehensive Physiology*, pages 1473–1508. American Cancer Society, 2011.
- [55] Jennifer West and James Moon. Vascularization of Engineered Tissues : Approaches to Promote Angiogenesis in Biomaterials. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 8(4) :300–310, March 2008.
- [56] Andrew C. Newman, Martin N. Nakatsu, Wayne Chou, Paul D. Gershon, and Christopher C. W. Hughes. The requirement for fibroblasts in angiogenesis : fibroblast-derived matrix proteins are essential for endothelial cell lumen formation. *Molecular Biology of the Cell*, 22(20) :3791–3800, October 2011.
- [57] Christopher CW Hughes. Endothelial ??stromal interactions in angiogenesis :. *Current Opinion in Hematology*, 15(3) :204–209, May 2008.
- [58] Craig K. Griffith, Cheryl Miller, Richard C.A. Sainson, Jay W. Calvert, Noo Li Jeon, Christopher C.W. Hughes, and Steven C. George. Diffusion Limits of an *in Vitro* Thick Prevascularized Tissue. *Tissue Engineering*, 11(1-2) :257–266, January 2005.
- [59] Sudong Kim, Hyunjae Lee, Minhwan Chung, and Noo Li Jeon. Engineering of functional, perfusable 3d microvascular networks on a chip. *Lab on a Chip*, 13(8) :1489, 2013.
- [60] Jordan A. Whisler, Michelle B. Chen, and Roger D. Kamm. Control of Perfusable Microvascular Network Morphology Using a Multiculture Microfluidic System. *Tissue Engineering Part C : Methods*, 20(7) :543–552, July 2014.
- [61] Monica L. Moya, Yu-Hsiang Hsu, Abraham P. Lee, Christopher C.W. Hughes, and Steven C. George. *In Vitro* Perfused Human Capillary Networks. *Tissue Engineering Part C : Methods*, 19(9) :730–737, September 2013.

- [62] Yu-Hsiang Hsu, Monica L. Moya, Parinaz Abiri, Christopher C.W. Hughes, Steven C. George, and Abraham P. Lee. Full range physiological mass transport control in 3d tissue cultures. *Lab Chip*, 13(1) :81–89, 2013.
- [63] Yu-Hsiang Hsu, Monica L. Moya, Christopher C. W. Hughes, Steven C. George, and Abraham P. Lee. A microfluidic platform for generating large-scale nearly identical human microphysiological vascularized tissue arrays. *Lab on a Chip*, 13(15) :2990, 2013.
- [64] Duc T. T. Phan, Xiaolin Wang, Brianna M. Craver, Agua Sobrino, Da Zhao, Jerry C. Chen, Lilian Y. N. Lee, Steven C. George, Abraham P. Lee, and Christopher C. W. Hughes. A vascularized and perfused organ-on-a-chip platform for large-scale drug screening applications. *Lab on a Chip*, 17(3) :511–520, 2017.
- [65] Agua Sobrino, Duc T. T. Phan, Rupsa Datta, Xiaolin Wang, Stephanie J. Hachey, Mónica Romero-López, Enrico Gratton, Abraham P. Lee, Steven C. George, and Christopher C. W. Hughes. 3d microtumors in vitro supported by perfused vascular networks. *Scientific Reports*, 6 :31589, 2016.
- [66] Yoojin Shin, Jessie S. Jeon, Sewoon Han, Gi-Seok Jung, Sehyun Shin, Sang-Hoon Lee, Ryo Sudo, Roger D. Kamm, and Seok Chung. In vitro 3d collective sprouting angiogenesis under orchestrated ANG-1 and VEGF gradients. *Lab on a Chip*, 11(13) :2175–2181, June 2011.
- [67] Seok Chung, Ryo Sudo, Peter J. Mack, Chen-Rei Wan, Vernella Vickerman, and Roger D. Kamm. Cell migration into scaffolds under co-culture conditions in a microfluidic platform. *Lab Chip*, 9(2) :269–275, 2009.
- [68] Seok Chung, Ryo Sudo, Vernella Vickerman, Ioannis Zervantonakis, and Roger Kamm. Microfluidic Platforms for Studies of Angiogenesis, Cell Migration, and Cell–Cell Interactions. *Ann. Biomed. Eng.*, 38, March 2012.
- [69] Matthew L Kutys and Christopher S Chen. Forces and mechanotransduction in 3d vascular biology. *Current Opinion in Cell Biology*, 42 :73–79, October 2016.
- [70] Sudong Kim, Minhwan Chung, Jungho Ahn, Somin Lee, and Noo Li Jeon. Interstitial flow regulates the angiogenic response and phenotype of endothelial cells in a 3d culture model. *Lab on a Chip*, 16(21) :4189–4199, 2016.
- [71] J. W. Song and L. L. Munn. Fluid forces control endothelial sprouting. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(37) :15342–15347, September 2011.
- [72] Hyunjae Lee, Sudong Kim, Minhwan Chung, Jeong Hun Kim, and Noo Li Jeon. A bioengineered array of 3d microvessels for vascular permeability assay. *Microvascular Research*, 91 :90–98, January 2014.
- [73] Jungho Ahn, Chong-Su Cho, Seong Woo Cho, Joo H. Kang, Sung-Yon Kim, Dal-Hee Min, Joon Myong Song, Tae-Eun Park, and Noo Li Jeon. Investigation on vascular cytotoxicity and extravascular transport of cationic polymer nanoparticles using perfusable 3d microvessel model. *Acta Biomaterialia*, 76 :154–163, August 2018.

-
- [74] V. van Duinen, D. Zhu, C. Ramakers, A. J. van Zonneveld, P. Vulto, and T. Hankemeier. Perfused 3d angiogenic sprouting in a high-throughput in vitro platform. *Angiogenesis*, 22(1) :157–165, February 2019.
- [75] Yuji Nashimoto, Tomoya Hayashi, Itsuki Kunita, Akiko Nakamasu, Yu-suke Torisawa, Masamune Nakayama, Hisako Takigawa-Imamura, Hidetoshi Kotera, Koichi Nishiyama, Takashi Miura, and Ryuji Yokokawa. Integrating perfusable vascular networks with a three-dimensional tissue in a microfluidic device. *Integrative Biology*, 9(6) :506–518, 2017.
- [76] Soojung Oh, Hyunryul Ryu, Dongha Tahk, Jihoon Ko, Yoojin Chung, Hae Kwang Lee, Tae Ryong Lee, and Noo Li Jeon. “Open-top” microfluidic device for in vitro three-dimensional capillary beds. *Lab Chip*, 17(20) :3405–3414, 2017.
- [77] James N. Topper and Michael A. Gimbrone Jr. Blood flow and vascular gene expression : fluid shear stress as a modulator of endothelial phenotype. *Molecular Medicine Today*, 5(1) :40–46, January 1999.
- [78] C. F. Dewey, S. R. Bussolari, M. A. Gimbrone, and P. F. Davies. The Dynamic Response of Vascular Endothelial Cells to Fluid Shear Stress. *Journal of Biomechanical Engineering*, 103(3) :177, 1981.
- [79] P F Davies, A Remuzzi, E J Gordon, C F Dewey, and M A Gimbrone. Turbulent fluid shear stress induces vascular endothelial cell turnover in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(7) :2114–2117, April 1986.
- [80] Jianbo Shao, Lei Wu, Jianzhang Wu, Yunhuan Zheng, Hui Zhao, Qinghui Jin, and Jianlong Zhao. Integrated microfluidic chip for endothelial cells culture and analysis exposed to a pulsatile and oscillatory shear stress. *Lab on a Chip*, 9(21) :3118–3125, November 2009.
- [81] Jonathan W. Song, Wei Gu, Nobuyuki Futai, Kristy A. Warner, Jacques E. Nor, and Shuichi Takayama. Computer-Controlled Microcirculatory Support System for Endothelial Cell Culture and Shearing. *Analytical Chemistry*, 77(13) :3993–3999, July 2005.
- [82] Adel M Malek and Seigo Izumo. Mechanism of endothelial cell shape change and cytoskeletal remodeling in response to fluid shear stress. page 14.
- [83] Jackson G. DeStefano, Zinnia S. Xu, Ashley J. Williams, Nahom Yimam, and Peter C. Searson. Effect of shear stress on iPSC-derived human brain microvascular endothelial cells (dhBMECs). *Fluids and Barriers of the CNS*, 14(1), December 2017.
- [84] María Virumbrales-Muñoz, José María Ayuso, Marta Olave, Rosa Monge, Diego de Miguel, Luis Martínez-Lostao, Séverine Le Gac, Manuel Doblare, Ignacio Ochoa, and Luis J. Fernandez. Multiwell capillarity-based microfluidic device for the study of 3d tumour tissue-2d endothelium interactions and drug screening in co-culture models. *Scientific Reports*, 7(1), December 2017.

- [85] Stephen Boyden. THE CHEMOTACTIC EFFECT OF MIXTURES OF ANTI-BODY AND ANTIGEN ON POLYMORPHONUCLEAR LEUCOCYTES. *The Journal of Experimental Medicine*, 115(3) :453–466, February 1962.
- [86] Vladimir Mastuyugin, Elizabeth McWhinnie, Mark Labow, and Frank Buxton. A Quantitative High-Throughput Endothelial Cell Migration Assay. *Journal of Biomolecular Screening*, 9(8) :712–718, December 2004.
- [87] P. Gorog and I. B. Kovacs. Inhibition of vascular smooth muscle cell migration by intact endothelium is nitric oxide-mediated : interference by oxidised low density lipoproteins. *Journal of Vascular Research*, 35(3) :165–169, June 1998.
- [88] Alice Santi, Anna Caselli, Francesco Ranaldi, Paolo Paoli, Camilla Mugnaioni, Elena Michelucci, and Paolo Cirri. Cancer associated fibroblasts transfer lipids and proteins to cancer cells through cargo vesicles supporting tumor growth. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1853(12) :3211–3223, December 2015.
- [89] Yu-Hua Li and Cheng Zhu. A modified Boyden chamber assay for tumor cell transendothelial migration. page 7.
- [90] Bryan Simoneau, François Houle, and Jacques Huot. Regulation of endothelial permeability and transendothelial migration of cancer cells by tropomyosin-1 phosphorylation. *Vascular Cell*, 4(1) :18, 2012.
- [91] Ali Flores-Pérez, Dolores Gallardo Rincón, Erika Ruiz-García, Raquel Echavarría, Laurence A. Marchat, Elizabeth Álvarez Sánchez, and César López-Camarillo. Angiogenesis Analysis by In Vitro Coculture Assays in Transwell Chambers in Ovarian Cancer. In Wei Wu, editor, *MicroRNA and Cancer : Methods and Protocols*, Methods in Molecular Biology, pages 179–186. Springer New York, New York, NY, 2018.
- [92] Hai Le-The, Martijn Tibbe, Joshua Loessberg-Zahl, Marciano Palma do Carmo, Marinke van der Helm, Johan Bomer, Albert van den Berg, Anne Leferink, Loes Segerink, and Jan Eijkel. Large-scale fabrication of free-standing and sub- μm PDMS through-hole membranes. *Nanoscale*, 10(16) :7711–7718, April 2018.
- [93] Jevgenia Zilberman-Rudenko, Joanna L. Sylman, Kathleen S. Garland, Cristina Puy, Andrew D. Wong, Peter C. Searson, and Owen J. T. McCarty. Utility of microfluidic devices to study the platelet–endothelium interface. *Platelets*, 28(5) :449–456, July 2017.
- [94] Martin Raasch, Knut Rennert, Tobias Jahn, Sven Peters, Thomas Henkel, Otmar Huber, Ingo Schulz, Holger Becker, Stefan Lorkowski, Harald Funke, and Alexander Mosig. Microfluidically supported biochip design for culture of endothelial cell layers with improved perfusion conditions. *Biofabrication*, March 2015.
- [95] Antony Thomas, Shunqiang Wang, Salman Sohrabi, Colin Orr, Ran He, Wentao Shi, and Yaling Liu. Characterization of vascular permeability using a biomimetic microfluidic blood vessel model. *Biomicrofluidics*, 11(2) :024102, March 2017.

-
- [96] Miwa Sato, Naoki Sasaki, Manabu Ato, Satoshi Hirakawa, Kiichi Sato, and Kae Sato. Microcirculation-on-a-Chip : A Microfluidic Platform for Assaying Blood- and Lymphatic-Vessel Permeability. *PLOS ONE*, 10(9) :e0137301, September 2015.
- [97] Ross Booth and Hanseup Kim. Characterization of a microfluidic in vitro model of the blood-brain barrier (μ BBB). *Lab on a Chip*, 12(10) :1784, 2012.
- [98] Balabhaskar Prabhakarpanthian, Ming-Che Shen, Joseph B. Nichols, Ivy R. Mills, Marta Sidoryk-Wegrzynowicz, Michael Aschner, and Kapil Pant. SyM-BBB : a microfluidic blood brain barrier model. *Lab on a Chip*, 13(6) :1093, 2013.
- [99] Paul P. Partyka, George A. Godsey, John R. Galie, Mary C. Kosciuk, Nimish K. Acharya, Robert G. Nagele, and Peter A. Galie. Mechanical stress regulates transport in a compliant 3d model of the blood-brain barrier. *Biomaterials*, 115 :30–39, January 2017.
- [100] Amedeo Carraro, Wen-Ming Hsu, Katherine M. Kulig, Wing S. Cheung, Mark L. Miller, Eli J. Weinberg, Eric F. Swart, Mohammad Kaazempur-Mofrad, Jeffrey T. Borenstein, Joseph P. Vacanti, and Craig Neville. In vitro analysis of a hepatic device with intrinsic microvascular-based channels. *Biomedical Microdevices*, 10(6) :795–805, December 2008.
- [101] D. Huh, B. D. Matthews, A. Mammoto, M. Montoya-Zavala, H. Y. Hsin, and D. E. Ingber. Reconstituting Organ-Level Lung Functions on a Chip. *Science*, 328(5986) :1662–1668, June 2010.
- [102] Manuele Gori, Maria Chiara Simonelli, Sara Maria Giannitelli, Luca Businaro, Marcella Trombetta, and Alberto Rainer. Investigating Nonalcoholic Fatty Liver Disease in a Liver-on-a-Chip Microfluidic Device. *PLOS ONE*, 11(7) :e0159729, July 2016.
- [103] Philip J. Lee, Paul J. Hung, and Luke P. Lee. An artificial liver sinusoid with a microfluidic endothelial-like barrier for primary hepatocyte culture. *Biotechnology and Bioengineering*, 97(5) :1340–1346, August 2007.
- [104] Fruzsina R. Walter, Sándor Valkai, András Kincses, András Petneházi, Tamás Czeller, Szilvia Veszélka, Pál Ormos, Mária A. Deli, and András Dér. A versatile lab-on-a-chip tool for modeling biological barriers. *Sensors and Actuators B : Chemical*, 222 :1209–1219, January 2016.
- [105] Xiang Yao, Rong Peng, and Jiandong Ding. Cell–Material Interactions Revealed Via Material Techniques of Surface Patterning. *Advanced Materials*, 25(37) :5257–5286, 2013.
- [106] Lauren L. Bischel, Kyung E. Sung, José A. Jiménez-Torres, Brianah Mader, Patricia J. Keely, and David J. Beebe. The importance of being a lumen. *The FASEB Journal*, 28(11) :4583–4590, November 2014.
- [107] D.-H. T. Nguyen, S. C. Stapleton, M. T. Yang, S. S. Cha, C. K. Choi, P. A. Galie, and C. S. Chen. Biomimetic model to reconstitute angiogenic sprouting morphogenesis in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(17) :6712–6717, April 2013.

- [108] Andrew P. Golden and Joe Tien. Fabrication of microfluidic hydrogels using molded gelatin as a sacrificial element. *Lab on a Chip*, 7(6) :720–725, May 2007.
- [109] Stella Alimperti, Teodelinda Mirabella, Varnica Bajaj, William Polacheck, Dana M. Pirone, Jeremy Duffield, Jeroen Eyckmans, Richard K. Assoian, and Christopher S. Chen. Three-dimensional biomimetic vascular model reveals a RhoA, Rac1, and N-cadherin balance in mural cell-endothelial cell-regulated barrier function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(33) :8758–8763, 2017.
- [110] Gavrielle M. Price, Keith H.K. Wong, James G. Truslow, Alexander D. Leung, Chitrangada Acharya, and Joe Tien. Effect of mechanical factors on the function of engineered human blood microvessels in microfluidic collagen gels. *Biomaterials*, 31(24) :6182–6189, August 2010.
- [111] Gavrielle M. Price, Kenneth M. Chrobak, and Joe Tien. Effect of cyclic AMP on barrier function of human lymphatic microvascular tubes. *Microvascular Research*, 76(1) :46–51, May 2008.
- [112] Keith H. K. Wong, James G. Truslow, and Joe Tien. The role of cyclic AMP in normalizing the function of engineered human blood microvessels in microfluidic collagen gels. *Biomaterials*, 31(17) :4706–4714, June 2010.
- [113] Kenneth M. Chrobak, Daniel R. Potter, and Joe Tien. Formation of perfused, functional microvascular tubes in vitro. *Microvascular Research*, 71(3) :185–196, May 2006.
- [114] Nasser Sadr, Mojun Zhu, Tatsuya Osaki, Takahiro Kakegawa, Yunzhi Yang, Matteo Moretti, Junji Fukuda, and Ali Khademhosseini. SAM-based Cell Transfer to Photopatterned Hydrogels for Microengineering Vascular-Like Structures. *Biomaterials*, 32 :7479–90, October 2011.
- [115] Duc-Huy T. Nguyen, Sarah C. Stapleton, Michael T. Yang, Susie S. Cha, Colin K. Choi, Peter A. Galie, and Christopher S. Chen. Biomimetic model to reconstitute angiogenic sprouting morphogenesis in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(17) :6712–6717, April 2013.
- [116] Hiroaki Yoshida, Michiya Matsusaki, and Mitsuru Akashi. Multilayered Blood Capillary Analogs in Biodegradable Hydrogels for In Vitro Drug Permeability Assays. *Advanced Functional Materials*, 23, April 2013.
- [117] A. Tan, K. Fujisawa, Y. Yukawa, and Y. T. Matsunaga. Bottom-up fabrication of artery-mimicking tubular co-cultures in collagen-based microchannel scaffolds. *Biomaterials Science*, 4(10) :1503–1514, 2016.
- [118] C. A. Stanness, E. Guatteo, and D. Janigro. A dynamic model of the blood-brain barrier 'in vitro'. *NeuroToxicology*, 17(2) :481–496, 1996.
- [119] Keith H. K. Wong, James G. Truslow, Aimal H. Khankhel, Kelvin L. S. Chan, and Joe Tien. Artificial lymphatic drainage systems for vascularized microfluidic

- scaffolds. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*, 101(8) :2181–2190, August 2013.
- [120] Cara F. Buchanan, Elizabeth E. Voigt, Christopher S. Szot, Joseph W. Freeman, Pavlos P. Vlachos, and Marissa Nichole Rylander. Three-Dimensional Microfluidic Collagen Hydrogels for Investigating Flow-Mediated Tumor-Endothelial Signaling and Vascular Organization. *Tissue Engineering Part C : Methods*, 20(1) :64–75, January 2014.
- [121] Jordan Miller, Kelly R Stevens, Michael T Yang, Brendon Baker, Duc-Huy Nguyen, Daniel Cohen, Esteban Toro, Alice A Chen, Peter Galie, Xiang Yu, Ritika Chaturvedi, Sangeeta N Bhatia, and Christopher Chen. Rapid casting of patterned vascular networks for perfusable engineered 3d tissues. *Nature materials*, 11 :768–74, July 2012.
- [122] Willie Wu, Adam DeConinck, and Jennifer A. Lewis. Omnidirectional Printing of 3d Microvascular Networks. *Advanced Materials*, 23(24) :H178–H183, June 2011.
- [123] David B. Kolesky, Kimberly A. Homan, Mark A. Skylar-Scott, and Jennifer A. Lewis. Three-dimensional bioprinting of thick vascularized tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(12) :3179–3184, March 2016.
- [124] Renganaden Sooppan, Samantha Paulsen, Jason Han, Anderson H Ta, Patrick V Dinh, Ann C Gaffey, Chantel Venkataraman, Alen Trubelja, George Hung, Jordan Miller, and Pavan Atluri. In vivo anastomosis and perfusion of a 3d printed construct containing microchannel networks. *Tissue engineering. Part C, Methods*, 22, September 2015.
- [125] Eleftherios Sachlos, N Reis, C Ainsley, Brian Derby, and Jan Czernuszka. Novel Collagen Scaffolds with Predefined Internal Morphology Made by Solid Freeform Fabrication. *Biomaterials*, 24 :1487–97, May 2003.
- [126] Luiz Bertassoni, Martina Cecconi, Vijayan Manoharan, Mehdi Nikkhah, Jesper Hjortnaes, Ana Luiza Cristino, Giada Barabaschi, Danilo Demarchi, Mehmet Dokmeci, Yunzhi Yang, and Ali Khademhosseini. Hydrogel Bioprinted Microchannel Networks for Vascularization of Tissue Engineering Constructs. *Lab on a chip*, 14, May 2014.
- [127] Shuai Li, Yuan-Yuan Liu, Li-Jun Liu, and Qing-Xi Hu. A Versatile Method for Fabricating Tissue Engineering Scaffolds with a Three-Dimensional Channel for Pre-vasculature Networks. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 8(38) :25096–25103, September 2016.
- [128] Tae-Yun Kang, Jung Min Hong, Jin Woo Jung, Hyun-Wook Kang, and Dong-Woo Cho. Construction of Large-Volume Tissue Mimics with 3d Functional Vascular Networks. *PLOS ONE*, 11(5) :e0156529, May 2016.
- [129] Ying Zheng, Junmei Chen, Michael Craven, Nak Won Choi, Samuel Totorica, Anthony Diaz-Santana, Pouneh Kermani, Barbara Hempstead, Claudia Fischbach-Teschl, José A. López, and Abraham D. Stroock. In vitro microvessels for the study

- of angiogenesis and thrombosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(24) :9342–9347, June 2012.
- [130] Lauren Lynn Bischel, Edmond W. K. Young, Brianah R. Mader, and David J. Beebe. Tubeless microfluidic angiogenesis assay with three-dimensional endothelial-lined microvessels. *Biomaterials*, 34(5) :1471–1477, 2013.
- [131] Christopher K. Arakawa, Barry A. Badeau, Ying Zheng, and Cole A. DeForest. Multicellular Vascularized Engineered Tissues through User-Programmable Biomaterial Photodegradation. *Advanced Materials*, 29(37) :1703156, October 2017.
- [132] Vivian K. Lee, Diana Y. Kim, Haygan Ngo, Young Lee, Lan Seo, Seung-Schik Yoo, Peter A. Vincent, and Guohao Dai. Creating perfused functional vascular channels using 3d bio-printing technology. *Biomaterials*, 35(28) :8092–8102, September 2014.
- [133] Kyle A. DiVito, Michael A. Daniele, Steven A. Roberts, Frances S. Ligler, and André A. Adams. Microfabricated blood vessels undergo neoangiogenesis. *Biomaterials*, 138 :142–152, September 2017.
- [134] Gregor Skeldon, Baltasar Lucendo-Villarin, and Wenmiao Shu. Three-dimensional bioprinting of stem-cell derived tissues for human regenerative medicine. *Philosophical Transactions of the Royal Society B : Biological Sciences*, 373(1750) :20170224, July 2018.
- [135] Bertrand Guillotin, Agnès Souquet, Sylvain Catros, Martí Duocastella, Benjamin Pippenger, Séverine Bellance, Reine Bareille, Murielle Rémy, Laurence Bordenave, Joëlle Amédée, and Fabien Guillemot. Laser assisted bioprinting of engineered tissue with high cell density and microscale organization. *Biomaterials*, 31 :7250–6, October 2010.
- [136] Xiaofeng Cui and Thomas Boland. Human microvasculature fabrication using thermal inkjet printing technology. *Biomaterials*, 30(31) :6221–6227, October 2009.
- [137] Kyle Christensen, Changxue xu, Wenxuan Chai, Zhengyi Zhang, Fu Jianzhong, and Yong Huang. Freeform Inkjet Printing of Cellular Structures with Bifurcations. *Biotechnology and bioengineering*, 112, May 2015.
- [138] Maria Yanez, Julio Rincon, Aracely Dones, Carmelo De Maria, Raoul Gonzales, and Thomas Boland. *In Vivo* Assessment of Printed Microvasculature in a Bilayer Skin Graft to Treat Full-Thickness Wounds. *Tissue Engineering Part A*, 21(1-2) :224–233, January 2015.
- [139] Saman Naghieh, Mohammad Reza Karamooz, Md Sarker, Eva Karki, and Xiongbiao Chen. Influence of Crosslinking on the Mechanical Behavior of 3d Printed Alginate Scaffolds : Experimental and Numerical Approaches. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 80, January 2018.
- [140] Saman Naghieh, M. Sarker, Mohammad Karamooz-Ravari, Adam McInnes, and Xiongbiao Chen. Modeling of the Mechanical Behavior of 3d Bioplotted Scaffolds Considering the Penetration in Interlocked Strands. *Applied Sciences*, 8(9) :1422, August 2018.

-
- [141] Zohreh Izadifar, Tuanjie Chang, William Kulyk, Xiongbiao Chen, and B. Frank Eames. Analyzing Biological Performance of 3d-Printed, Cell-Impregnated Hybrid Constructs for Cartilage Tissue Engineering. *Tissue Engineering Part C : Methods*, 22(3) :173–188, March 2016.
- [142] Fu You, Xia Wu, Ning Zhu, Ming Lei, Brian Frank Eames, and Xiongbiao Chen. 3d Printing of Porous Cell-Laden Hydrogel Constructs for Potential Applications in Cartilage Tissue Engineering. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 2, June 2016.
- [143] Md Sarker, Mohammad Izadifar, David Schreyer, and Xiongbiao Chen. Influence of ionic cross linkers (Ca²⁺ / Ba²⁺ / Zn²⁺) on the Mechanical and Biological Properties of 3d Bioprinted Hydrogel Scaffolds. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 29 :1–51, January 2018.
- [144] Tao Xu, Weixin Zhao, Jian-Ming Zhu, Mohammad Albanna, James J Yoo, and Anthony Atala. Complex heterogeneous tissue constructs containing multiple cell types prepared by inkjet printing technology. *Biomaterials*, 34, October 2012.
- [145] Ibrahim Ozbolat and Yin Yu. Bioprinting Toward Organ Fabrication : Challenges and Future Trends. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, January 2013.
- [146] Falguni Pati, Jinah Jang, Jae-Woo Lee, and dong-woo Cho. Extrusion Bioprinting. pages 123–152. December 2015.
- [147] Liliang Ouyang, Rui Yao, Shuangshuang Mao, Xi Chen, Jie Na, and Wei Sun. Three-dimensional bioprinting of embryonic stem cells directs highly uniform embryoid body formation. *Biofabrication*, 7 :044101, November 2015.
- [148] Saif Khalil and Wei Sun. Bioprinting Endothelial Cells With Alginate for 3d Tissue Constructs. *Journal of biomechanical engineering*, 131 :111002, November 2009.
- [149] Cyrille Norotte, Françoise Marga, Laura E Niklason, and Gabor Forgacs. Scaffold-Free Vascular Tissue Engineering Using Bioprinting. *Biomaterials*, 30 :5910–7, September 2009.
- [150] Yahui Zhang, Yin Yu, Howard Chen, and Ibrahim T Ozbolat. Characterization of printable cellular micro-fluidic channels for tissue engineering. *Biofabrication*, 5(2) :025004, March 2013.
- [151] Saman Naghieh, Md Sarker, Mohammad Izadifar, and Xiongbiao Chen. Dispensing-Based Bioprinting of Mechanically-Functional Hybrid Scaffolds with Vessel-like Channels for Tissue Engineering Applications – A Brief Review. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 78 :298–314, February 2018.
- [152] Yahui Zhang, Yin Yu, and Ibrahim T. Ozbolat. Direct Bioprinting of Vessel-Like Tubular Microfluidic Channels. *Journal of Nanotechnology in Engineering and Medicine*, 4(2) :020902, July 2013.
- [153] Yongxiang Luo, Anja Lode, and Michael Gelinsky. Direct Plotting of Three-Dimensional Hollow Fiber Scaffolds Based on Concentrated Alginate Pastes for Tissue Engineering. *Advanced healthcare materials*, 2, June 2013.

- [154] Yin Yu, Yahui Zhang, James A. Martin, and Ibrahim T. Ozbolat. Evaluation of Cell Viability and Functionality in Vessel-like Bioprintable Cell-Laden Tubular Channels. *Journal of Biomechanical Engineering*, 135(9) :091011, July 2013.
- [155] Weitao Jia, P. Selcan Gungor-Ozkerim, Yu Shrike Zhang, Kan Yue, Kai Zhu, Wanjun Liu, Qingment Pi, Batzaya Byambaa, Mehmet Remzi Dokmeci, Su Ryon Shin, and Ali Khademhosseini. Direct 3d bioprinting of perfusable vascular constructs using a blend bioink. *Biomaterials*, 106 :58–68, 2016.
- [156] Thomas J. Hinton, Quentin Jallerat, Rachelle N. Palchesko, Joon Hyung Park, Martin S. Grodzicki, Hao-Jan Shue, Mohamed H. Ramadan, Andrew R. Hudson, and Adam W. Feinberg. Three-dimensional printing of complex biological structures by freeform reversible embedding of suspended hydrogels. *Science Advances*, 1(9) :e1500758, October 2015.
- [157] Atabak Ghanizadeh Tabriz, Christopher G. Mills, John J. Mullins, Jamie A. Davies, and Wenmiao Shu. Rapid Fabrication of Cell-Laden Alginate Hydrogel 3d Structures by Micro Dip-Coating. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 5, February 2017.
- [158] F Guillemot, A Souquet, Sylvain Catros, B Guillotin, J Lopez, Marc Faucon, Benjamin Pippenger, Reine Bareille, M Rémy, Séverine Bellance, Patrick Chabassier, jean christophe Fricain, and J Amédée. High-throughput laser printing of cells and biomaterials for tissue engineering. *Acta biomaterialia*, 6 :2494–500, October 2009.
- [159] A. Ping Zhang, Xin Qu, Pranav Soman, Kolin C. Hribar, Jin W. Lee, Shaochen Chen, and Sailing He. Rapid Fabrication of Complex 3d Extracellular Microenvironments by Dynamic Optical Projection Stereolithography. *Advanced Materials*, 24(31) :4266–4270, August 2012.
- [160] Xia Ouyang, Kunyu Zhang, Jushuai Wu, Dexter Siu-Hong Wong, Qian Feng, Liming Bian, and A. Ping Zhang. Optical μ -Printing of Cellular-Scale Microscaffold Arrays for 3d Cell Culture. *Scientific Reports*, 7(1), December 2017.
- [161] Wei Zhu, Xin Qu, Jie Zhu, Xuanyi Ma, Sherrina Patel, Justin Liu, Pengrui Wang, Cheuk Sun Edwin Lai, Maling Gou, Yang Xu, Kang Zhang, and Shaochen Chen. Direct 3d bioprinting of prevascularized tissue constructs with complex microarchitecture. *Biomaterials*, 124 :106–115, 2017.
- [162] Mehdi Nikkhah, Nouran Eshak, Pinar Zorlutuna, Nasim Annabi, Marco Castello, Keekyoung Kim, Alireza Dolatshahi-Pirouz, Faramarz Edalat, Hojae Bae, Yunzhi Yang, and Ali Khademhosseini. Directed endothelial cell morphogenesis in micropatterned gelatin methacrylate hydrogels. *Biomaterials*, 33(35) :9009–9018, December 2012.
- [163] James C. Culver, Joseph C. Hoffmann, Ross A. Poché, John H. Slater, Jennifer L. West, and Mary E. Dickinson. Three-Dimensional Biomimetic Patterning in Hydrogels to Guide Cellular Organization. *Advanced Materials*, 24(17) :2344–2348, May 2012.

-
- [164] Hironobu Ikehata and Tetsuya Ono. The Mechanisms of UV Mutagenesis. *Journal of Radiation Research*, 52(2) :115–125, 2011.
- [165] François Auger, Laure Gibot, and Dan Lacroix. The Pivotal Role of Vascularization in Tissue Engineering. *Annual review of biomedical engineering*, 15, April 2013.
- [166] Vladimir Mironov, Vladimir Kasyanov, and Roger R Markwald. Organ printing : from bioprinter to organ biofabrication line. *Current Opinion in Biotechnology*, 22(5) :667–673, October 2011.
- [167] Lindsay Corstorphine and Michael V. Sefton. Effectiveness factor and diffusion limitations in collagen gel modules containing HepG2 cells. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 5(2) :119–129, February 2011.
- [168] A. P. McGuigan and M. V. Sefton. Vascularized organoid engineered by modular assembly enables blood perfusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(31) :11461–11466, August 2006.
- [169] Judy Yeh, Yibo Ling, Jeffrey M. Karp, Jay Gantz, Akash Chandawarkar, George Eng, James Blumling III, Robert Langer, and Ali Khademhosseini. Micromolding of shape-controlled, harvestable cell-laden hydrogels. *Biomaterials*, 27(31) :5391–5398, November 2006.
- [170] Dylan M Dean, Anthony P Napolitano, Jacquelyn Youssef, and Jeffrey R Morgan. Rods, tori, and honeycombs : The directed self-assembly of microtissues with prescribed microscale geometries. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 21 :4005–12, January 2008.
- [171] Jens Kelm, Valentin Djonov, Lars Ittner, David Fluri, Walter Born, Simon P. Hoersttrup, and Martin Fussenegger. Design of Custom-Shaped Vascularized Tissues Using Microtissue Spheroids as Minimal Building Units. *Tissue Engineering*, page 060913044658050, June 2006.
- [172] Y. Du, E. Lo, S. Ali, and A. Khademhosseini. Directed assembly of cell-laden microgels for fabrication of 3d tissue constructs. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(28) :9522–9527, July 2008.
- [173] Jason W. Nichol and Ali Khademhosseini. Modular tissue engineering : engineering biological tissues from the bottom up. *Soft Matter*, 5(7) :1312, 2009.
- [174] Omar F. Khan, Derek N. Voice, Brendan M. Leung, and Michael V. Sefton. A Novel High-Speed Production Process to Create Modular Components for the Bottom-Up Assembly of Large-Scale Tissue-Engineered Constructs. *Advanced Healthcare Materials*, 4(1) :113–120, January 2015.
- [175] T.P. Cooper and M.V. Sefton. Fibronectin coating of collagen modules increases in vivo HUVEC survival and vessel formation in SCID mice. *Acta Biomaterialia*, 7(3) :1072–1083, March 2011.
- [176] Michael Dean Chamberlain, Rohini Gupta, and Michael V. Sefton. Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells Enhance Chimeric Vessel Development Driven

- by Endothelial Cell-Coated Microtissues. *Tissue Engineering Part A*, 18(3-4) :285–294, February 2012.
- [177] Pranay Agarwal, Hai Wang, Mingrui Sun, Jiangsheng Xu, Shuting Zhao, Zhenguo Liu, Keith J. Gooch, Yi Zhao, Xiongbin Lu, and Xiaoming He. Microfluidics Enabled Bottom-Up Engineering of 3d Vascularized Tumor for Drug Discovery. *ACS Nano*, 11(7) :6691–6702, July 2017.
- [178] Masakazu Inamori, Hiroshi Mizumoto, and Toshihisa Kajiwara. Investigation of medium perfusion through scaffold-free tissue constructs using endothelial cell-covered spheroids in vitro. *Biochemical Engineering Journal - BIOCHEM ENG J*, 50 :116–121, July 2010.
- [179] Meiling Zhong, Wei Dan, You Yang, Jing Sun, Xuening Chen, Likun Guo, Qingrong Wei, Yizao Wan, Hongsong Fan, and Xingdong Zhang. Vascularization in Engineered Tissue Construct by Assembly of Cellular Patterned Micromodules and Degradable Microspheres. *ACS applied materials & interfaces*, 9, January 2017.
- [180] Xiaoxi Yang, Omid Forouzan, Jennie M. Burns, and Sergey S. Shevkoplyas. Traffic of leukocytes in microfluidic channels with rectangular and rounded cross-sections. *Lab on a Chip*, 11(19) :3231, 2011.
- [181] P. A. Galie, A. van Oosten, C. S. Chen, and P. A. Janmey. Application of multiple levels of fluid shear stress to endothelial cells plated on polyacrylamide gels. *Lab on a Chip*, 15(4) :1205–1212, 2015.
- [182] Elsie S Place, Nicholas D Evans, and Molly M Stevens. Complexity in Biomaterials for Tissue Engineering. *Nature materials*, 8 :457–70, July 2009.
- [183] I. S. Kinstlinger and J. S. Miller. 3d-printed fluidic networks as vasculature for engineered tissue. *Lab on a chip*, 16(11) :2025–2043, May 2016.
- [184] Simone Bersini, Iman K. Yazdi, Giuseppe Talò, Su Ryon Shin, Matteo Moretti, and Ali Khademhosseini. Cell-microenvironment interactions and architectures in microvascular systems. *Biotechnology Advances*, 34(6) :1113–1130, November 2016.
- [185] Tatsuya Osaki, Vivek Sivathanu, and Roger D Kamm. Vascularized microfluidic organ-chips for drug screening, disease models and tissue engineering. *Current Opinion in Biotechnology*, 52 :116–123, August 2018.
- [186] Dongeun Huh, Daniel C. Leslie, Benjamin D. Matthews, Jacob P. Fraser, Samuel Jurek, Geraldine A. Hamilton, Kevin S. Thorneloe, Michael Allen McAlexander, and Donald E. Ingber. A Human Disease Model of Drug Toxicity-Induced Pulmonary Edema in a Lung-on-a-Chip Microdevice. *Science Translational Medicine*, 4(159) :159ra147–159ra147, November 2012.
- [187] Duc TT Phan, R Hugh F Bender, Jillian W Andrejecs, Agua Sobrino, Stephanie J Hachey, Steven C George, and Christopher CW Hughes. Blood-brain barrier-on-a-chip : Microphysiological systems that capture the complexity of the blood-central nervous system interface. *Experimental Biology and Medicine*, 242(17) :1669–1678, November 2017.

-
- [188] Anette Wolff, Maria Antfolk, Birger Brodin, and Maria Tenje. In Vitro Blood–Brain Barrier Models—An Overview of Established Models and New Microfluidic Approaches. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 104(9) :2727–2746, September 2015.
- [189] Mototsugu Eiraku, Kiichi Watanabe, Mami Matsuo-Takasaki, Masako Kawada, Shigenobu Yonemura, Michiru Matsumura, Takafumi Wataya, Ayaka Nishiyama, Keiko Muguruma, and Yoshiki Sasai. Self-Organized Formation of Polarized Cortical Tissues from ESCs and Its Active Manipulation by Extrinsic Signals. *Cell Stem Cell*, 3(5) :519–532, November 2008.
- [190] Anca M Pasca, Steven A Sloan, Laura E Clarke, Yuan Tian, Christopher D Makinson, Nina Huber, Chul Hoon Kim, Jin-Young Park, Nancy A O’Rourke, Khoa D Nguyen, Stephen J Smith, John R Huguenard, Daniel H Geschwind, Ben A Barres, and Sergiu P Paşca. Functional cortical neurons and astrocytes from human pluripotent stem cells in 3d culture. *Nature Methods*, 12(7) :671–678, July 2015.
- [191] Madeline A. Lancaster, Magdalena Renner, Carol-Anne Martin, Daniel Wenzel, Louise S. Bicknell, Matthew E. Hurles, Tessa Homfray, Josef M. Penninger, Andrew P. Jackson, and Juergen A. Knoblich. Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. *Nature*, 501(7467) :373–379, September 2013.
- [192] Fikri Birey, Jimena Andersen, Christopher D. Makinson, Saiful Islam, Wu Wei, Nina Huber, H. Christina Fan, Kimberly R. Cordes Metzler, Georgia Panagiotakos, Nicholas Thom, Nancy A. O’Rourke, Lars M. Steinmetz, Jonathan A. Bernstein, Joachim Hallmayer, John R. Huguenard, and Sergiu P. Paşca. Assembly of functionally integrated human forebrain spheroids. *Nature*, 545(7652) :54–59, May 2017.
- [193] Chun-Ting Lee, Raphael M. Bendriem, Wells W. Wu, and Rong-Fong Shen. 3d brain Organoids derived from pluripotent stem cells : promising experimental models for brain development and neurodegenerative disorders. *Journal of Biomedical Science*, 24(1), December 2017.
- [194] Iva Kelava and Madeline A. Lancaster. Dishing out mini-brains : Current progress and future prospects in brain organoid research. *Developmental Biology*, 420(2) :199–209, December 2016.
- [195] Chen-Ta Ho, Ruei-Zeng Lin, Wen-Yu Chang, Hwan-You Chang, and Cheng-Hsien Liu. Rapid heterogeneous liver-cell on-chip patterning via the enhanced field-induced dielectrophoresis trap. *Lab on a chip*, 6(6) :724–734, 2006.
- [196] Da Yoon No, Kwang-Ho Lee, Iijae Seo, and Sang-Hoon Lee. 3d liver models on a microplatform : well-defined culture, engineering of liver tissue and liver-on-a-chip. *Lab Chip*, 15, July 2015.
- [197] Massimo Sargiacomo, Paolo Onori, Elena Bravo, Antonio Franchitto, Alfredo Cantafora, Stefano Barca, Cesare Peschle, and Eugenio Gaudio. Long-term cultures of human fetal liver cells : a three-dimensional experimental model for monitoring liver tissue development. *Journal of Hepatology*, 28(3) :480–490, March 1998.

- [198] Yue Yu, James E. Fisher, Joseph B. Lillegard, Brian Rodysill, Bruce Amiot, and Scott L. Nyberg. Cell therapies for liver diseases. *Liver Transplantation*, 18(1) :9–21, January 2012.
- [199] Kazuo Takayama, Kenji Kawabata, Yasuhito Nagamoto, Keisuke Kishimoto, Katsuhisa Tashiro, Fuminori Sakurai, Masashi Tachibana, Katsuhiko Kanda, Takao Hayakawa, Miho Kusuda Furue, and Hiroyuki Mizuguchi. 3d spheroid culture of hESC/hiPSC-derived hepatocyte-like cells for drug toxicity testing. *Biomaterials*, 34(7) :1781–1789, February 2013.
- [200] Murielle Dufresne, Nhu Tran, Stephanie Capone, Martine Daujat, and Cecile Legallais. Microencapsulation and Bioreactors for Liver Support. pages 425–447. January 2013.
- [201] S. Figaro, U. Pereira, H. Rada, N. Semenzato, D. Pouchoulin, and C. Legallais. Development and validation of a bioartificial liver device with fluidized bed bioreactors hosting alginate-encapsulated hepatocyte spheroids. pages 1335–1338. IEEE, August 2015.
- [202] Sarah Figaro, Ulysse Pereira, Hiram RADA, Nicolas Semenzato, Dominique Pouchoulin, Patrick Paullier, Murielle Dufresne, and Cécile Legallais. Optimizing the fluidized bed bioreactor as an external bioartificial liver. *The International journal of artificial organs*, 40, March 2017.
- [203] Takanori Takebe, Keisuke Sekine, Masahiro Enomura, Hiroyuki Koike, Masaki Kimura, Takunori Ogaeri, Ran-Ran Zhang, Yasuharu Ueno, Yun-Wen Zheng, Naoto Koike, Shinsuke Aoyama, Yasuhisa Adachi, and Hideki Taniguchi. Vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant. *Nature*, 499(7459) :481–484, July 2013.
- [204] Takanori Takebe, Ran-Ran Zhang, Hiroyuki Koike, Masaki Kimura, Emi Yoshizawa, Masahiro Enomura, Naoto Koike, Keisuke Sekine, and Hideki Taniguchi. Generation of a vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant. *Nature Protocols*, 9(2) :396–409, February 2014.
- [205] Kazuki Sasaki, Takami Akagi, Tadafumi Asaoka, Hidetoshi Eguchi, Yasunari Fukuda, Yoshifumi Iwagami, Daisaku Yamada, Takehiro Noda, Hiroshi Wada, Kunito Gotoh, Koichi Kawamoto, Yuichiro Doki, Masaki Mori, and Mitsuru Akashi. Construction of three-dimensional vascularized functional human liver tissue using a layer-by-layer cell coating technique. *Biomaterials*, 133 :263–274, July 2017.
- [206] Basak E Uygun, Alejandro Soto-Gutierrez, Hiroshi Yagi, Maria-Louisa Izamis, Maria A Guzzardi, Carley Shulman, Jack Milwid, Naoya Kobayashi, Arno Tilles, Francois Berthiaume, Martin Hertl, Yaakov Nahmias, Martin L Yarmush, and Korkut Uygun. Organ reengineering through development of a transplantable recellularized liver graft using decellularized liver matrix. *Nature Medicine*, 16(7) :814–820, July 2010.
- [207] Hiroshi Yagi, Ken Fukumitsu, Kazumasa Fukuda, Minoru Kitago, Masahiro Shinoda, Hideaki Obara, Osamu Itano, Shigeyuki Kawachi, Minoru Tanabe, Gina M.

- Coudriet, Jon D. Piganelli, Thomas W. Gilbert, Alejandro Soto-Gutierrez, and Yuko Kitagawa. Human-Scale Whole-Organ Bioengineering for Liver Transplantation : A Regenerative Medicine Approach. *Cell Transplantation*, 22(2) :231–242, February 2013.
- [208] Pedro M. Baptista, Mohummad M. Siddiqui, Genevieve Lozier, Sergio R. Rodriguez, Anthony Atala, and Shay Soker. The use of whole organ decellularization for the generation of a vascularized liver organoid. *Hepatology*, 53(2) :604–617, February 2011.
- [209] Alejandro Soto-Gutierrez, Li Zhang, Chris Medberry, Ken Fukumitsu, Denver Faulk, Hongbin Jiang, Janet Reing, Roberto Gramignoli, Junji Komori, Mark Ross, Masaki Nagaya, Eric Lagasse, Donna Stolz, Stephen C. Strom, Ira J. Fox, and Stephen F. Badylak. A Whole-Organ Regenerative Medicine Approach for Liver Replacement. *Tissue Engineering Part C : Methods*, 17(6) :677–686, June 2011.
- [210] Kyung Hyun Moon, In Kap Ko, James J. Yoo, and Anthony Atala. Kidney diseases and tissue engineering. *Methods*, 99 :112–119, April 2016.
- [211] Cécile Legallais, Dooli Kim, Sylvia M. Mihaila, Milos Mihajlovic, Marina Figliuzzi, Barbara Bonandrini, Simona Salerno, Fjodor A. Yousef Yengej, Maarten B. Rookmaaker, Natalia Sanchez Romero, Pilar Sainz Arnal, Ulysse Pereira, Mattia Pasqua, Karin G. F. Gerritsen, Marianne C. Verhaar, Andrea Remuzzi, Pedro M. Baptista, Loredana De Bartolo, Rosalinde Masereeuw, and Dimitrios Stamatialis. Bioengineering Organs for Blood Detoxification. *Advanced Healthcare Materials*, 7(21) :1800430, 2018.
- [212] Ashutosh Agarwal, Josue Adrian Goss, Alexander Cho, Megan Laura McCain, and Kevin Kit Parker. Microfluidic heart on a chip for higher throughput pharmacological studies. *Lab on a Chip*, 13(18) :3599, 2013.
- [213] Gang Wang, Megan L McCain, Luhan Yang, Aibin He, Francesco Silvio Pasqualini, Ashutosh Agarwal, Hongyan Yuan, Dawei Jiang, Donghui Zhang, Lior Zangi, Judith Geva, Amy E Roberts, Qing Ma, Jian Ding, Jinghai Chen, Da-Zhi Wang, Kai Li, Jiwu Wang, Ronald J A Wanders, Wim Kulik, Frédéric M Vaz, Michael A Laflamme, Charles E Murry, Kenneth R Chien, Richard I Kelley, George M Church, Kevin Kit Parker, and William T Pu. Modeling the mitochondrial cardiomyopathy of Barth syndrome with induced pluripotent stem cell and heart-on-chip technologies. *Nature Medicine*, 20(6) :616–623, June 2014.
- [214] Julia Günter, Petra Wolint, Annina Bopp, Julia Steiger, Elena Cambria, Simon P. Hoerstrup, and Maximilian Y. Emmert. Microtissues in Cardiovascular Medicine : Regenerative Potential Based on a 3d Microenvironment. *Stem Cells International*, 2016 :1–20, 2016.
- [215] Liudmila Polonchuk, Mamta Chabria, Laura Badi, Jean-Christophe Hoflack, Gemma Figtree, Michael J. Davies, and Carmine Gentile. Cardiac spheroids as promising in vitro models to study the human heart microenvironment. *Scientific Reports*, 7(1), December 2017.

- [216] L. L. Y. Chiu, M. Montgomery, Y. Liang, H. Liu, and M. Radisic. Perfusable branching microvessel bed for vascularization of engineered tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(50) :E3414–E3423, December 2012.
- [217] Ingra Vollert, Moritz Seiffert, Johanna Bachmair, Merle Sander, Alexandra Eder, Lenard Conradi, Alexander Vogelsang, Thomas Schulze, June Uebeler, Wolfgang Holthoner, Heinz Redl, Hermann Reichenspurner, Arne Hansen, and Thomas Eschenhagen. In vitro perfusion of engineered heart tissue through endothelialized channels. *Tissue Engineering. Part A*, 20(3-4) :854–863, February 2014.
- [218] Richard A. D Carano and Ellen H Filvaroff. Angiogenesis and bone repair. *Drug Discovery Today*, 8(21) :980–989, November 2003.
- [219] J. Street, M. Bao, L. deGuzman, S. Bunting, F. V. Peale, N. Ferrara, H. Steinmetz, J. Hoeffel, J. L. Cleland, A. Daugherty, N. van Bruggen, H. P. Redmond, R. A. D. Carano, and E. H. Filvaroff. Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(15) :9656–9661, July 2002.
- [220] Haitao Cui, Wei Zhu, Margaret Nowicki, Xuan Zhou, Ali Khademhosseini, and Lijie Grace Zhang. Hierarchical Fabrication of Engineered Vascularized Bone Biphasic Constructs via Dual 3d Bioprinting : Integrating Regional Bioactive Factors into Architectural Design. *Advanced Healthcare Materials*, 5(17) :2174–2181, September 2016.
- [221] Cristina Correia, Warren L. Grayson, Miri Park, Daphne Hutton, Bin Zhou, X. Edward Guo, Laura Niklason, Rui A. Sousa, Rui L. Reis, and Gordana Vunjak-Novakovic. In Vitro Model of Vascularized Bone : Synergizing Vascular Development and Osteogenesis. *PLoS ONE*, 6(12) :e28352, December 2011.
- [222] Norhana Jusoh, Soojung Oh, Sudong Kim, Jangho Kim, and Noo Li Jeon. Microfluidic vascularized bone tissue model with hydroxyapatite-incorporated extracellular matrix. *Lab on a Chip*, 15(20) :3984–3988, 2015.
- [223] Simone Bersini, Mara Gilardi, Chiara Arrigoni, Giuseppe Talò, Moreno Zamai, Luigi Zagra, Valeria Caiolfa, and Matteo Moretti. Human in vitro 3d co-culture model to engineer vascularized bone-mimicking tissues combining computational tools and statistical experimental approach. *Biomaterials*, 76 :157–172, January 2016.
- [224] Simone Bersini, Jessie S. Jeon, Gabriele Dubini, Chiara Arrigoni, Seok Chung, Joseph L. Charest, Matteo Moretti, and Roger D. Kamm. A microfluidic 3d in vitro model for specificity of breast cancer metastasis to bone. *Biomaterials*, 35(8) :2454–2461, March 2014.
- [225] Jessie S. Jeon, Simone Bersini, Mara Gilardi, Gabriele Dubini, Joseph L. Charest, Matteo Moretti, and Roger D. Kamm. Human 3d vascularized organotypic microfluidic assays to study breast cancer cell extravasation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(1) :214–219, January 2015.

-
- [226] Michelle B. Chen, Jordan A. Whisler, Jessie S. Jeon, and Roger D. Kamm. Mechanisms of tumor cell extravasation in an in vitro microvascular network platform. *Integrative Biology : Quantitative Biosciences from Nano to Macro*, 5(10) :1262–1271, October 2013.
- [227] I. K. Zervantonakis, S. K. Hughes-Alford, J. L. Charest, J. S. Condeelis, F. B. Gertler, and R. D. Kamm. Three-dimensional microfluidic model for tumor cell intravasation and endothelial barrier function. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(34) :13515–13520, August 2012.
- [228] Hidekazu Sekine, Tatsuya Shimizu, Katsuhisa Sakaguchi, Izumi Dobashi, Masanori Wada, Masayuki Yamato, Eiji Kobayashi, Mitsuo Umezue, and Teruo Okano. In vitro fabrication of functional three-dimensional tissues with perfusable blood vessels. *Nature Communications*, 4(1), June 2013.
- [229] Boyang Zhang, Miles Montgomery, M. Dean Chamberlain, Shinichiro Ogawa, Anastasia Korolj, Aric Pahnke, Laura A. Wells, Stéphane Massé, Jihye Kim, Lewis Reis, Abdul Momen, Sara S. Nunes, Aaron R. Wheeler, Kumaraswamy Nanthakumar, Gordon Keller, Michael V. Sefton, and Milica Radisic. Biodegradable scaffold with built-in vasculature for organ-on-a-chip engineering and direct surgical anastomosis. *Nature Materials*, 15(6) :669–678, June 2016.
- [230] Janick D. Stucki, Nina Hobi, Artur Galimov, Andreas O. Stucki, Nicole Schneider-Daum, Claus-Michael Lehr, Hanno Huwer, Manfred Frick, Manuela Funke-Chambour, Thomas Geiser, and Olivier T. Guenat. Medium throughput breathing human primary cell alveolus-on-chip model. *Scientific Reports*, 8(1), December 2018.
- [231] Yosuke Nakao, Hiroshi Kimura, Yasuyuki Sakai, and Teruo Fujii. Bile canaliculi formation by aligning rat primary hepatocytes in a microfluidic device. *Biomicrofluidics*, 5(2) :022212, June 2011.
- [232] Da Yoon No, Gi Seok Jeong, and Sang-Hoon Lee. Immune-protected xenogeneic bioartificial livers with liver-specific microarchitecture and hydrogel-encapsulated cells. *Biomaterials*, 35(32) :8983–8991, October 2014.
- [233] Wen Zhu, Jiwei Li, and Jianfeng Liu. The cell engineering construction and function evaluation of multi-layer biochip dialyzer. *Biomedical Microdevices*, 15(5) :781–791, October 2013.
- [234] Marianne K. Vormann, Linda Gijzen, Simon Hutter, Lisette Boot, Arnaud Nicolas, Angelique van den Heuvel, Jelle Vriend, Chee Ping Ng, Tom T. G. Nieskens, Vincent van Duinen, Bjorn de Wagenaar, Rosalinde Masereeuw, Laura Suter-Dick, Sebastiaan J. Trietsch, Martijn Wilmer, Jos Joore, Paul Vulto, and Henriette L. Lanz. Nephrotoxicity and Kidney Transport Assessment on 3d Perfused Proximal Tubules. *The AAPS Journal*, 20(5), September 2018.
- [235] G. Adriani, D. Ma, A. Pavesi, E. L. K. Goh, and R. D. Kamm. Modeling the Blood-Brain Barrier in a 3d triple co-culture microfluidic system. pages 338–341. *IEEE*, August 2015.

- [236] Jacquelyn A. Brown, Virginia Pensabene, Dmitry A. Markov, Vanessa Allwardt, M. Diana Neely, Mingjian Shi, Clayton M. Britt, Orlando S. Hoilett, Qing Yang, Bryson M. Brewer, Philip C. Samson, Lisa J. McCawley, James M. May, Donna J. Webb, Deyu Li, Aaron B. Bowman, Ronald S. Reiserer, and John P. Wikswo. Recreating blood-brain barrier physiology and structure on chip : A novel neurovascular microfluidic bioreactor. *Biomicrofluidics*, 9(5) :054124, September 2015.
- [237] Maierdanjiang Wufuer, GeonHui Lee, Woojune Hur, Byoungjun Jeon, Byung Jun Kim, Tae Hyun Choi, and SangHoon Lee. Skin-on-a-chip model simulating inflammation, edema and drug-based treatment. *Scientific Reports*, 6(1), December 2016.
- [238] Hasan E. Abaci, Zongyou Guo, Abigail Coffman, Brian Gillette, Wen-han Lee, Samuel K. Sia, and Angela M. Christiano. Human Skin Constructs with Spatially Controlled Vasculature Using Primary and iPSC-Derived Endothelial Cells. *Advanced Healthcare Materials*, 5(14) :1800–1807, July 2016.
- [239] Fuyin Zheng, Fanfan Fu, Yao Cheng, Chunyan Wang, Yuanjin Zhao, and Zhongze Gu. Organ-on-a-Chip Systems : Microengineering to Biomimic Living Systems. *Small*, 12(17) :2253–2282, 2016.
- [240] David B. Kolesky, Ryan L. Truby, A. Sydney Gladman, Travis A. Busbee, Kimberly A. Homan, and Jennifer A. Lewis. 3d Bioprinting of Vascularized, Heterogeneous Cell-Laden Tissue Constructs. *Advanced Materials*, 26(19) :3124–3130, May 2014.
- [241] Yi-Shuan J. Li, Jason H. Haga, and Shu Chien. Molecular basis of the effects of shear stress on vascular endothelial cells. *Journal of Biomechanics*, 38(10) :1949–1971, October 2005.
- [242] R.-P. Franke, M. Gräfe, H. Schnittler, D. Seiffge, C. Mittermayer, and D. Drenckhahn. Induction of human vascular endothelial stress fibres by fluid shear stress. *Nature*, 307(5952) :648–649, February 1984.
- [243] Hiroyuki Inoguchi, Takashi Tanaka, Yoshihiko Maehara, and Takehisa Matsuda. The effect of gradually graded shear stress on the morphological integrity of a huvec-seeded compliant small-diameter vascular graft. *Biomaterials*, 28(3) :486–495, January 2007.
- [244] C. G. Galbraith, R. Skalak, and S. Chien. Shear stress induces spatial reorganization of the endothelial cell cytoskeleton. *Cell Motility*, 40(4) :317–330, 1998.
- [245] Annemarie E. Silver and Joseph A. Vita. Shear Stress–Mediated Arterial Remodeling in Atherosclerosis : Too Much of a Good Thing ? *Circulation*, 113(24) :2787–2789, June 2006.
- [246] Joshua B. Slee and Linda J. Lowe-Krentz. Actin realignment and cofilin regulation are essential for barrier integrity during shear stress. *Journal of Cellular Biochemistry*, 114(4) :782–795, April 2013.
- [247] Ying-Li Hu, Song Li, Hui Miao, Tsui-Chun Tsou, Miguel Del Pozo, and Shu Chien. Roles of Microtubule Dynamics and Small GTPase Rac in Endothelial Cell Migration

- and Lamellipodium Formation under Flow. *Journal of vascular research*, 39 :465–76, November 2002.
- [248] Pin-Pin Hsu, Song Li, Yi-Shuan Li, Shunichi Usami, Anthony Ratcliffe, Xiong Wang, and Shu Chien. Effects of Flow Patterns on Endothelial Cell Migration into a Zone of Mechanical Denudation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 285(3) :751–759, July 2001.
- [249] Yan-Ting Shiu, Song Li, Suli Yuan, YingXiao Wang, Phu Nguyen, and Shu Chien. Shear stress-induced c-fos activation is mediated by Rho in a calcium-dependent manner. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 303(2) :548–555, April 2003.
- [250] S. Dimmeler, B. Assmus, C. Hermann, J. Haendeler, and A. M. Zeiher. Fluid shear stress stimulates phosphorylation of Akt in human endothelial cells : involvement in suppression of apoptosis. *Circulation Research*, 83(3) :334–341, August 1998.
- [251] Dimmeler Stefanie, Hermann Corinna, Galle Jan, and Zeiher Andreas M. Upregulation of Superoxide Dismutase and Nitric Oxide Synthase Mediates the Apoptosis-Suppressive Effects of Shear Stress on Endothelial Cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 19(3) :656–664, March 1999.
- [252] Stefanie Dimmeler, Judith Haendeler, Michael Nehls, and Andreas M. Zeiher. Suppression of Apoptosis by Nitric Oxide via Inhibition of Interleukin-1beta-converting Enzyme (ICE)-like and Cysteine Protease Protein (CPP)-32-like Proteases. *The Journal of Experimental Medicine*, 185(4) :601–608, February 1997.
- [253] Nicolas Baeyens, Chirosree Bandyopadhyay, Brian G. Coon, Sanguk Yun, and Martin A. Schwartz. Endothelial fluid shear stress sensing in vascular health and disease. *The Journal of Clinical Investigation*, 126(3) :821–828.
- [254] Nicolas Baeyens and Martin A. Schwartz. Biomechanics of vascular mechanosensation and remodeling. *Molecular Biology of the Cell*, 27(1) :7–11, January 2016.
- [255] Akinori Ueda, Masaki Koga, Mariko Ikeda, Susumu Kudo, and Kazuo Tanishita. Effect of shear stress on microvessel network formation of endothelial cells with in vitro three-dimensional model. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 287(3) :H994–H1002, September 2004.
- [256] Hojin Kang, Kayla J. Bayless, and Roland Kaunas. Fluid shear stress modulates endothelial cell invasion into three-dimensional collagen matrices. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 295(5) :H2087–H2097, November 2008.
- [257] Masafumi Watanabe, Koki Yano, Koki Okawa, Tadahiro Yamashita, Kazuki Tajima, Kazuaki Sawada, Hiroshi Yagi, Yuko Kitagawa, Kazuo Tanishita, and Ryo Sudo. Construction of sinusoid-scale microvessels in perfusion culture of a decellularized liver. *Acta Biomaterialia*, 95 :307–318, September 2019.

- [258] Yukiko T. Matsunaga, Yuya Morimoto, and Shoji Takeuchi. Molding Cell Beads for Rapid Construction of Macroscopic 3d Tissue Architecture. *Advanced Materials*, 23(12) :H90–H94, March 2011.
- [259] Shelley L. Anna, Nathalie Bontoux, and Howard A. Stone. Formation of dispersions using “flow focusing” in microchannels. *Applied Physics Letters*, 82(3) :364–366, January 2003.
- [260] Yung-Chieh Tan, Vittorio Cristini, and Abraham P. Lee. Monodispersed microfluidic droplet generation by shear focusing microfluidic device. *Sensors and Actuators B : Chemical*, 114(1) :350–356, March 2006.
- [261] Ian C. McLean, Luke A. Schwerdtfeger, Stuart A. Tobet, and Charles S. Henry. Powering *ex vivo* tissue models in microfluidic systems. *Lab on a Chip*, 18(10) :1399–1410, 2018.
- [262] Erwin Berthier, E Young, and David Beebe. Engineers are from PDMS-land, Biologists are from Polystyrenia. *Lab on a chip*, 12 :1224–37, March 2012.
- [263] Rajeeb K. Jena and C. Y. Yue. Cyclic olefin copolymer based microfluidic devices for biochip applications : Ultraviolet surface grafting using 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine. *Biomicrofluidics*, 6(1) :012822, March 2012.
- [264] Yuya Morimoto, Maiko Onuki, and Shoji Takeuchi. Mass Production of Cell-Laden Calcium Alginate Particles with Centrifugal Force. *Advanced healthcare materials*, 6, April 2017.
- [265] J. G. Santiago, S. T. Wereley, C. D. Meinhart, D. J. Beebe, and R. J. Adrian. A particle image velocimetry system for microfluidics. *Experiments in Fluids*, 25(4) :316–319, September 1998.
- [266] Michael Olsen and Ronald Adrian. Brownian motion and correlation in particle image velocimetry. *Optics & Laser Technology*, 32 :621–627, October 2000.
- [267] C. D. Meinhart, S. T. Wereley, and M. H. B. Gray. Volume illumination for two-dimensional particle image velocimetry. *Measurement Science and Technology*, 11(6) :809–814, May 2000.
- [268] Ralph Lindken, Massimiliano Rossi, Sebastian Große, and Jerry Westerweel. Micro-Particle Image Velocimetry (μ PIV) : Recent developments, applications, and guidelines. *Lab on a Chip*, 9(17) :2551, 2009.
- [269] Debjyoti Sen, David S. Nobes, and Sushanta K. Mitra. Optical measurement of pore scale velocity field inside microporous media. *Microfluidics and Nanofluidics*, 12(1-4) :189–200, January 2012.
- [270] Maria Rosaria Vetrano, Vincent Ruwet, Frederic Lebeau, Patricia Corieri, Jeroen Beeck, and M.L. Riethmuller. Applications de la micro - PIV dans des écoulements libre et confiné. September 2008.
- [271] Peter Vennemann, Ken Kiger, Ralph Lindken, Bianca C.W. Groenendijk, Sandra Stekelenburg-de Vos, Timo ten Hagen, Nicolette Ursem, Robert Poelmann, Jerry

- Westerweel, and Beerend Hierck. In vivo micro particle image velocimetry measurements of blood-plasma in the embryonic avian heart. *Journal of biomechanics*, 39 :1191–200, February 2006.
- [272] Jerry Westerweel, P F. Geelhoed, and Ralph Lindken. Single-pixel resolution ensemble correlation for micro-PIV applications. *Experiments in Fluids*, 37 :375–384, September 2004.
- [273] Aurélie Bidoret, Evandro Martins, B. Smet, and Denis Poncelet. Cell Microencapsulation : Dripping Methods. In *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, volume 1479, pages 43–55. October 2017.
- [274] Lord Rayleigh. On The Instability Of Jets. *Proceedings of the London Mathematical Society*, s1-10(1) :4–13, November 1878.
- [275] S. Haeberle, Lars Naegele, Robert Burger, Roland Zengerle, and Jens Ducrée. Alginate micro-bead fabrication on a centrifugal microfluidics platform. pages 497–500, February 2007.
- [276] Jens Ducrée, Stefan Haeberle, Sascha Lutz, Sarah Pausch, Felix von Stetten, and Roland Zengerle. The centrifugal microfluidic Bio-Disk platform. *Journal of Micro-mechanics and Microengineering*, 17(7) :S103–S115, July 2007.
- [277] Zhao-Miao Liu, Yang Yang, Yu Du, and Yan Pang. Advances in Droplet-Based Microfluidic Technology and Its Applications. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 45(2) :282–296, February 2017.
- [278] Hao Gu, Michael Duits, and Frieder Mugele. Droplets Formation and Merging in Two-Phase Flow Microfluidics. *International journal of molecular sciences*, 12 :2572–97, December 2011.
- [279] Pingan Zhu and Liqiu Wang. Passive and active droplet generation with microfluidics : a review. *Lab Chip*, 17 :34–75, November 2016.
- [280] Shia-Yen Teh, Robert Lin, Lung-Hsin Hung, and Abraham P. Lee. Droplet microfluidics. *Lab on a Chip*, 8(2) :198–220, January 2008.
- [281] Goran Vladislavjević, Nauman Khalid, Marcos Neves, Takashi Kuroiwa, Mitsutoshi Nakajima, Kunihiko Uemura, Sosaku Ichikawa, and Isao Kobayashi. Industrial lab-on-a-chip : Design, applications and scale-up for drug discovery and delivery. *Advanced drug delivery reviews*, 65, July 2013.
- [282] Shelley L. Anna, Nathalie Bontoux, and Howard A. Stone. Formation of dispersions using “flow focusing” in microchannels. *Applied Physics Letters*, 82(3) :364–366, January 2003.
- [283] S. Takeuchi, P. Garstecki, D. B. Weibel, and G. M. Whitesides. An Axisymmetric Flow-Focusing Microfluidic Device. *Advanced Materials*, 17(8) :1067–1072, April 2005.
- [284] Shelley L. Anna and Hans C. Mayer. Microscale tipstreaming in a microfluidic flow focusing device. *Physics of Fluids*, 18(12) :121512, December 2006.

- [285] Luca Gasperini, João F. Mano, and Rui L. Reis. Natural polymers for the microencapsulation of cells. *Journal of the Royal Society, Interface / the Royal Society*, 11, November 2014.
- [286] Paul de Vos, Hamideh Aghajani, Denis Poncelet, and Marijke Faas. Polymers in cell encapsulation from an enveloped cell perspective. *Advanced drug delivery reviews*, 67, November 2013.
- [287] Ronke Olabisi. Cell microencapsulation with synthetic polymers : Synthetic Cell Microencapsulation. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 103, August 2014.
- [288] Andries van der Meer, Valeria V Orlova, Peter Ten Dijke, Albert Van den Berg, and Christine L Mummery. Three-dimensional co-cultures of human endothelial cells and embryonic stem cell-derived pericytes inside a microfluidic device. *Lab on a chip*, 13, May 2013.
- [289] Ryo Sudo, Seok Chung, Ioannis K. Zervantonakis, Vernella Vickerman, Yasuko Toshimitsu, Linda G. Griffith, and Roger D. Kamm. Transport-mediated angiogenesis in 3d epithelial coculture. *The FASEB Journal*, 23(7) :2155–2164, July 2009.
- [290] Yun Xiao, Boyang Zhang, Haijiao Liu, Jason W. Miklas, Mark Gagliardi, Aric Pahnke, Nimalan Thavandiran, Yu Sun, Craig Simmons, Gordon Keller, and Milica Radisic. Microfabricated perfusable cardiac biowire : a platform that mimics native cardiac bundle. *Lab on a Chip*, 14(5) :869–882, March 2014.
- [291] Scott S. Verbridge, Anirikh Chakrabarti, Peter DelNero, Brian Kwee, Jeffrey D. Varner, Abraham D. Stroock, and Claudia Fischbach. Physicochemical regulation of endothelial sprouting in a 3d microfluidic angiogenesis model. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*, 101(10) :2948–2956, October 2013.
- [292] David Eyre. Collagen of articular cartilage. *Arthritis Research*, 4(1) :30–35, 2002.
- [293] Matthew D. Shoulders and Ronald T. Raines. Collagen structure and stability. *Annual Review of Biochemistry*, 78 :929–958, 2009.
- [294] G. N. Ramachandran. Stereochemistry of collagen*. *International Journal of Peptide and Protein Research*, 31(1) :1–16, 1988.
- [295] D.J.S. Hulmes. Collagen Diversity, Synthesis and Assembly. In Peter Fratzl, editor, *Collagen : Structure and Mechanics*, pages 15–47. Springer US, Boston, MA, 2008.
- [296] T.J. Wess. Collagen Fibrillar Structure and Hierarchies. In Peter Fratzl, editor, *Collagen : Structure and Mechanics*, pages 49–80. Springer US, Boston, MA, 2008.
- [297] Frederick Silver. Type I collagen fibrillogenesis in vitro. Additional evidence for the assembly mechanism. *Journal of Biological Chemistry*.
- [298] K. E. Kadler, D. F. Holmes, J. A. Trotter, and J. A. Chapman. Collagen fibril formation. *The Biochemical Journal*, 316 (Pt 1) :1–11, May 1996.
- [299] W. D. Comper and A. Veis. The mechanism of nucleation for in vitro collagen fibril formation. *Biopolymers*, 16(10) :2113–2131, October 1977.

-
- [300] M. Djabourov, J. P. Lechaire, and F. Gaill. Structure and rheology of gelatin and collagen gels. *Biorheology*, 30(3-4) :191–205, August 1993.
- [301] R. A. Gelman, B. R. Williams, and K. A. Piez. Collagen fibril formation. Evidence for a multistep process. *The Journal of Biological Chemistry*, 254(1) :180–186, January 1979.
- [302] Henry Schwarcz, Diab Abueidda, and Iwona Jasiuk. The Ultrastructure of Bone and Its Relevance to Mechanical Properties. *Frontiers in Physics*, 5 :39, September 2017.
- [303] Dimitar R. Stamov and Tilo Pompe. Structure and function of ECM-inspired composite collagen type I scaffolds. *Soft Matter*, 8(40) :10200–10212, September 2012.
- [304] Frédéric Gobeaux. PHASES DENSES DE COLLAGÈNE DE TYPE I : TRANSITION ISOTROPE/CHOLESTÉRIQUE, FIBRILLOGENÈSE ET MINÉRALISATION. January 2007.
- [305] François Portier. Biomateriaux collagène / gélatine : des phases cristal-liquides aux matériaux hybrides. page 270.
- [306] Jiranuwat Sapudom, Stefan Rubner, Steve Martin, Tony Kurth, Stefanie Riedel, Claudia T. Mierke, and Tilo Pompe. The phenotype of cancer cell invasion controlled by fibril diameter and pore size of 3d collagen networks. *Biomaterials*, 52 :367–375, June 2015.
- [307] J. R. Harris and A. Reiber. Influence of saline and pH on collagen type I fibrillogenesis in vitro : fibril polymorphism and colloidal gold labelling. *Micron (Oxford, England : 1993)*, 38(5) :513–521, 2007.
- [308] Christopher B. Raub, Jay Unruh, Vinod Suresh, Tatiana Krasieva, Tore Lindmo, Enrico Gratton, Bruce J. Tromberg, and Steven C. George. Image correlation spectroscopy of multiphoton images correlates with collagen mechanical properties. *Biophysical Journal*, 94(6) :2361–2373, March 2008.
- [309] Christopher B. Raub, Vinod Suresh, Tatiana Krasieva, Julia Lyubovitsky, Justin D. Mih, Andrew J. Putnam, Bruce J. Tromberg, and Steven C. George. Noninvasive assessment of collagen gel microstructure and mechanics using multiphoton microscopy. *Biophysical Journal*, 92(6) :2212–2222, March 2007.
- [310] Jieliang Zhu and Laura J. Kaufman. Collagen I Self-Assembly : Revealing the Developing Structures that Generate Turbidity. *Biophysical Journal*, 106(8) :1822–1831, April 2014.
- [311] S.T. Kreger, B.J. Bell, J. Bailey, E. Stites, J. Kuske, B. Waisner, and S.L. Voytik-Harbin. Polymerization and matrix physical properties as important design considerations for soluble collagen formulations. *Biopolymers*, pages NA–NA, 2010.
- [312] Pranay Agarwal, Jung Kyu Choi, Haishui Huang, Shuting Zhao, Jenna Dumbleton, Jianrong Li, and Xiaoming He. A Biomimetic Core-Shell Platform for Miniaturized 3d Cell and Tissue Engineering. *Particle & Particle Systems Characterization*, 32(8) :809–816, August 2015.

- [313] Sungmin Hong, Hui-Ju Hsu, Roland Kaunas, and Jun Kameoka. Collagen microsphere production on a chip. *Lab on a Chip*, 12(18) :3277, 2012.
- [314] L. Yu, S. M. Grist, S. S. Nasseri, E. Cheng, Y.-C. E. Hwang, C. Ni, and K. C. Cheung. Core-shell hydrogel beads with extracellular matrix for tumor spheroid formation. *Biomicrofluidics*, 9(2) :024118, March 2015.
- [315] Hon Fai Chan, Ying Zhang, and Kam W. Leong. Efficient One-Step Production of Microencapsulated Hepatocyte Spheroids with Enhanced Functions. *Small*, 12(20) :2720–2730, May 2016.
- [316] Junghyo Yoon, Jaehoon Kim, Hyo Eun Jeong, Ryo Sudo, Myung-Jin Park, and Seok Chung. Fabrication of type I collagen microcarrier using a microfluidic 3d T-junction device and its application for the quantitative analysis of cell–ECM interactions. *Biofabrication*, 8(3) :035014, August 2016.
- [317] Xiangchen Che, Jacob Nuhn, Ian Schneider, and Long Que. High Throughput Studies of Cell Migration in 3d Microtissues Fabricated by a Droplet Microfluidic Chip. *Micromachines*, 7(5) :84, May 2016.
- [318] Yuya Morimoto, Risa Tanaka, and Shoji Takeuchi. Construction of 3d, Layered Skin, Microsized Tissues by Using Cell Beads for Cellular Function Analysis. *Advanced Healthcare Materials*, 2(2) :261–265, February 2013.
- [319] Sravani Jalgama, Po-Jung Huang, and Jun Kameoka. Novel 3d coaxial flow-focusing nozzle device for the production of monodispersed collagen microspheres. pages 4220–4223. IEEE, August 2016.
- [320] Masakazu Inamori, Hiroshi Mizumoto, and Toshihisa Kajiwara. An Approach for Formation of Vascularized Liver Tissue by Endothelial Cell–Covered Hepatocyte Spheroid Integration. *Tissue Engineering Part A*, 15(8) :2029–2037, August 2009.
- [321] Masakazu Inamori, Hiroshi Mizumoto, and Toshihisa Kajiwara. Investigation of medium perfusion through scaffold-free tissue constructs using endothelial cell-covered spheroids in vitro. *Biochemical Engineering Journal*, 50(3) :116–121, July 2010.
- [322] Satoru Yoshida, Masahiro Takinoue, and Hiroaki Onoe. Anisotropic spherical collagen microparticles for confined 3d cell culture system with spatially designed microenvironment. pages 263–266, January 2016.
- [323] Ta-Jen Wu, Hsiu-Hsuan Huang, Yuan-Ming Hsu, Shaw-Ruey Lyu, and Yng Jiin Wang. A novel method of encapsulating and cultivating adherent mammalian cells within collagen microcarriers. *Biotechnology and Bioengineering*, 98(3) :578–585, October 2007.
- [324] Song-Bin Huang, Yu-Han Chang, Hsin-Chieh Lee, Shiao-Wen Tsai, and Min-Hsien Wu. A pneumatically-driven microfluidic system for size-tunable generation of uniform cell-encapsulating collagen microbeads with the ultrastructure similar to native collagen. *Biomedical Microdevices*, 16(3) :345–354, June 2014.
- [325] Hugo Doméjean, Mathieu de la Motte Saint Pierre, Anette Funfak, Nicolas Atrux-Tallau, Kevin Alessandri, Pierre Nassoy, Jérôme Bibette, and Nicolas Bremond.

- Controlled production of sub-millimeter liquid core hydrogel capsules for parallelized 3d cell culture. *Lab on a Chip*, 17(1) :110–119, 2017.
- [326] Ana Y. Rioja, Ramkumar Tiruvannamalai Annamalai, Spencer Paris, Andrew J. Putnam, and Jan P. Stegemann. Endothelial sprouting and network formation in collagen- and fibrin-based modular microbeads. *Acta Biomaterialia*, 29 :33–41, January 2016.
- [327] A. W. Peterson, D. J. Caldwell, A. Y. Rioja, R. R. Rao, A. J. Putnam, and J. P. Stegemann. Vasculogenesis and angiogenesis in modular collagen–fibrin microtissues. *Biomater. Sci.*, 2(10) :1497–1508, 2014.
- [328] Anna Batorsky, Jiehong Liao, Amanda W. Lund, George E. Plopper, and Jan P. Stegemann. Encapsulation of adult human mesenchymal stem cells within collagen-agarose microenvironments. *Biotechnology and Bioengineering*, 92(4) :492–500, November 2005.
- [329] Lorella Marinucci, Cinzia Lilli, Mario Guerra, Salvatore Belcastro, Ennio Becchetti, Giordano Stabellini, Edoardo Calvi, and Paola Locci. Biocompatibility of collagen membranes crosslinked with glutaraldehyde or diphenylphosphoryl azide : An in vitro study. *Journal of biomedical materials research. Part A*, 67 :504–9, November 2003.
- [330] Paul de Vos, Hamideh Aghajani Lazarjani, Denis Poncelet, and Marijke M. Faas. Polymers in cell encapsulation from an enveloped cell perspective. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 67-68 :15–34, April 2014.
- [331] Ýrr A. Mørch. Novel Alginate Microcapsules for Cell Therapy. 2008.
- [332] Gregor T. Grant, Edwin R. Morris, David A. Rees, Peter J. C. Smith, and David Thom. Biological interactions between polysaccharides and divalent cations : The egg-box model. *FEBS Letters*, 32(1) :195–198, May 1973.
- [333] R. Kohn and B. Larsen. Preparation of water-soluble polyuronic acids and their calcium salts, and the determination of calcium ion activity in relation to the degree of polymerization. *Acta Chemica Scandinavica*, 26(6) :2455–2468, 1972.
- [334] B. T. Stokke, O. Smidsrod, F. Zanetti, W. Strand, and G. Skjak-Braek. Distribution of uronate residues in alginate chains in relation to alginate gelling properties. 2. Enrichment of beta-D-mannuronic acid and depletion of alpha-L-guluronic acid in sol fraction. *Carbohydrate polymers*, 1993.
- [335] X. D. Liu, W. Y. Yu, Y. Zhang, W. M. Xue, W. T. Yu, Y. Xiong, X. J. Ma, Y. Chen, and Q. Yuan. Characterization of structure and diffusion behaviour of Ca-alginate beads prepared with external or internal calcium sources. *Journal of Microencapsulation*, 19(6) :775–782, December 2002.
- [336] Lai Wah Chan, Huey Ying Lee, and Paul W. S. Heng. Mechanisms of external and internal gelation and their impact on the functions of alginate as a coat and delivery system. *Carbohydrate Polymers*, 63(2) :176–187, February 2006.

- [337] Sheau Wen Tsai, Ming Jung Jeng, Ruey Yug Tsay, and Yng Jiin Wang. Gel beads composed of collagen reconstituted in alginate. *Biotechnology Techniques*, 12(1) :21–23, January 1998.
- [338] Ran Su, Xiao-Li Zhu, Dai-Di Fan, Yu Mi, Chan-Yuan Yang, and Xin Jia. Encapsulation of probiotic *Bifidobacterium longum* BIOMA 5920 with alginate–human-like collagen and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions. *International Journal of Biological Macromolecules*, 49(5) :979–984, December 2011.
- [339] Redouan Mahou, Alexander E Vlahos, Avital Shulman, and Michael V. Sefton. Interpenetrating Alginate–Collagen Polymer Network Microspheres for Modular Tissue Engineering. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 4(11) :3704–3712, November 2018.
- [340] Kazuki Maeda, Hiroaki Onoe, Masahiro Takinoue, and Shoji Takeuchi. Controlled Synthesis of 3d Multi-Compartmental Particles with Centrifuge-Based Microdroplet Formation from a Multi-Barrelled Capillary. *Advanced Materials*, 24(10) :1340–1346, March 2012.
- [341] Mei Liu, Xiao-Ting Sun, Chun-Guang Yang, and Zhang-Run Xu. On-chip preparation of calcium alginate particles based on droplet templates formed by using a centrifugal microfluidic technique. *Journal of Colloid and Interface Science*, 466 :20–27, March 2016.
- [342] Masayuki Hayakawa, Satoshi Umeyama, Ken Nagai, Hiroaki Onoe, and Masahiro Takinoue. Controlled Construction of Stable Network Structure Composed of Honeycomb-Shaped Microhydrogels. *Life*, 8(4) :38, September 2018.
- [343] Thomas Hales, Mark Adams, Gertrud Bauer, Tat Dat Dang, John Harrison, Le Truong Hoang, Cezary Kaliszyk, Victor Magron, Sean Mclaughlin, Tat Thang Nguyen, Quang Truong Nguyen, Tobias Nipkow, Steven Obua, Joseph Pleso, Jason Rute, Alexey Solovyev, Thi Hoai An Ta, Nam Trung Tran, Thi Diep Trieu, Josef Urban, Ky Vu, and Roland Zumkeller. A FORMAL PROOF OF THE KEPLER CONJECTURE. *Forum of Mathematics, Pi*, 5, 2017.
- [344] G. David Scott. Packing of Spheres : Packing of Equal Spheres. *Nature*, 188(4754) :908–909, December 1960.
- [345] T. Aste, M. Saadatfar, and T. Senden. Geometrical structure of disordered sphere packings. *Physical Review E*, 71(6), June 2005.
- [346] G. D. Scott and D. M. Kilgour. The density of random close packing of spheres. *Journal of Physics D : Applied Physics*, 2(6) :863–866, June 1969.
- [347] George Y. Onoda and Eric G. Liniger. Random loose packings of uniform spheres and the dilatancy onset. *Physical Review Letters*, 64(22) :2727–2730, May 1990.
- [348] Etienne Guyon and Jean-Paul Troadec. *Du sac de billes au tas de sable*. Odile Jacob, September 1994. Google-Books-ID : LfqtUfeQbdgC.

-
- [349] L.W. Rong, K.J. Dong, and A.B. Yu. Lattice-Boltzmann simulation of fluid flow through packed beds of spheres : Effect of particle size distribution. *Chemical Engineering Science*, 116 :508–523, September 2014.
- [350] Y. B. Lu and G. H. Tang. Experimental Investigation of Fluid Through Porous Media Packed with Single-Diameter and Multi-diameter Spheres. *Transport in Porous Media*, 110(3) :449–459, December 2015.
- [351] Luc Oger. *Etude des corrélations structure-propriétés dans les milieux granulaires modèles*. thesis, Rennes 1, January 1987.
- [352] Franck Lominé. Ecoulements de particules dans un milieu poreux. page 205.
- [353] G.T. Nolan and P.E. Kavanagh. The size distribution of interstices in random packings of spheres. *Powder Technology*, 78(3) :231–238, March 1994.
- [354] R.Y. Yang, R.P. Zou, A.B. Yu, and S.K. Choi. Pore structure of the packing of fine particles. *Journal of Colloid and Interface Science*, 299(2) :719–725, July 2006.
- [355] M. Mahdi Roozbahani, Lori Graham-Brady, and J. Frost. Mechanical trapping of fine particles in a medium of mono-sized randomly packed spheres. *International Journal for Numerical and Analytical Methods in Geomechanics*, 38, December 2014.
- [356] M. Mahdi Roozbahani, Rodrigo Borela, and J. David Frost. Pore Size Distribution in Granular Material Microstructure. *Materials*, 10(11) :1237, November 2017.
- [357] F. A. L. Dullien. *Porous Media : Fluid Transport and Pore Structure*. Academic Press, December 2012. Google-Books-ID : pPJCOKfZGPkC.
- [358] Empilements aléatoires de sphères de tailles égales [Sciences et Technologies des Poudres].
- [359] Arno Klerk. Voidage Variation in Packed Beds at Small Column to Particle Diameter Ratio. *AIChE Journal*, 49 :2022–2029, August 2003.
- [360] Gary E. Mueller. Radial void fraction distributions in randomly packed fixed beds of uniformly sized spheres in cylindrical containers. *Powder Technology*, 72(3) :269–275, November 1992.
- [361] Gary Mueller. Radial porosity in packed beds of spheres. *Powder Technology - POWDER TECHNOL*, 203 :626–633, November 2010.
- [362] R. F. Benenati and C. B. Brosilow. Void fraction distribution in beds of spheres. *AIChE Journal*, 8(3) :359–361.
- [363] Mohammed Nasif Abbas. Modeling Of Porosity Equation For Water Flow Through Packed Bed Of Monosize Spherical Packing. 15 :22, 2011.
- [364] Ricardo Dias, José Teixeira, Manuel Mota, and Alexander Yelshin. Tortuosity variation in a low density binary particulate bed. *Separation and Purification Technology*, 51 :180–184, September 2006.
- [365] Pradeep K. Agarwal and Brian K. O'Neill. Transport phenomena in multi-particle systems—I. Pressure drop and friction factors : Unifying the hydraulic-radius and

- submerged-object approaches. *Chemical Engineering Science*, 43(9) :2487–2499, January 1988.
- [366] Claudine Jacquet. Caractérisation géométrique et propriétés de transport de milieux poreux consolidés. page 177.
- [367] ADRIAN E. SCHEIDEGGER. *The Physics of Flow Through Porous Media (3rd Edition)*. University of Toronto Press, 1974.
- [368] E. C. Childs, N. Collis-George, and Geoffrey Ingram Taylor. The permeability of porous materials. *Proceedings of the Royal Society of London. Series A. Mathematical and Physical Sciences*, 201(1066) :392–405, April 1950.
- [369] Shiyi Chen and Gary D. Doolen. LATTICE BOLTZMANN METHOD FOR FLUID FLOWS. *Annual Review of Fluid Mechanics*, 30(1) :329–364, January 1998.
- [370] Zhang Nan, Sun Zhongning, and Ding Ming. Computational fluid dynamics simulations of fluid flow in random packed bed with spheres. May 2015.
- [371] Vishal A. Patil and James A. Liburdy. Turbulent flow characteristics in a randomly packed porous bed based on particle image velocimetry measurements. *Physics of Fluids*, 25(4) :043304, April 2013.
- [372] Shervin Khayamyan, T. Staffan Lundström, J. Gunnar I. Hellström, Per Gren, and Henrik Lycksam. Measurements of Transitional and Turbulent Flow in a Randomly Packed Bed of Spheres with Particle Image Velocimetry. *Transport in Porous Media*, 116(1) :413–431, January 2017.
- [373] Kuniyasu Ogawa, Takeshi Matsuka, Shuichiro Hirai, and Ken Okazaki. Three-dimensional velocity measurement of complex interstitial flows through water-saturated porous media by the tagging method in the MRI technique. *Measurement Science and Technology*, 12(2) :172–180, February 2001.
- [374] Vishal A. Patil and James A. Liburdy. Flow characterization using PIV measurements in a low aspect ratio randomly packed porous bed. *Experiments in Fluids*, 54(4) :1497, March 2013.
- [375] L.W. Rong, K.J. Dong, and A.B. Yu. Lattice-Boltzmann simulation of fluid flow through packed beds of uniform spheres : Effect of porosity. *Chemical Engineering Science*, 99 :44–58, August 2013.
- [376] L. Lebon, L. Oger, J. Leblond, J. P. Hulin, N. S. Martys, and L. M. Schwartz. Pulsed gradient NMR measurements and numerical simulation of flow velocity distribution in sphere packings. *Physics of Fluids*, 8(2) :293–301, February 1996.
- [377] Debjyoti Sen, David S. Nobes, and Sushanta K. Mitra. Statistical Analysis of Velocity Fields Obtained From Experimental Study of Micro-Porous Media. pages 789–795. American Society of Mechanical Engineers, July 2012.
- [378] Sujit S. Datta, H. Chiang, T. S. Ramakrishnan, and David A. Weitz. Spatial Fluctuations of Fluid Velocities in Flow through a Three-Dimensional Porous Medium. *Physical Review Letters*, 111(6), August 2013.

-
- [379] Sujin Lee and Seok Kim. Advanced Particle-Based Velocimetry Techniques for Microscale Flows. *Microfluidics and Nanofluidics*, 6 :577–588, May 2009.
- [380] Vishal A. Patil and James A. Liburdy. Optical measurement uncertainties due to refractive index mismatch for flow in porous media. *Experiments in Fluids*, 53(5) :1453–1468, November 2012.
- [381] D. Sinton. Microscale flow visualization. *Microfluidics and Nanofluidics*, 1(1) :2–21, November 2004.
- [382] Lateef Akanji and Stephan Matthai. Finite Element-Based Characterization of Pore-Scale Geometry and Its Impact on Fluid Flow. *Transport in Porous Media*, 81 :241–259, January 2010.
- [383] Leo Benning, Ludwig Gutzweiler, Kevin Tröndle, Julian Riba, Roland Zengerle, Peter Koltay, Stefan Zimmermann, Gerhard Stark, and Günter Finkenzeller. Assessment of hydrogels for bioprinting of endothelial cells. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 106, November 2017.
- [384] Adem Yildirim, Muge Turkeydin, Bora Garipcan, and Mehmet Bayindir. Cytotoxicity of multifunctional surfactant containing capped mesoporous silica nanoparticles. *RSC Advances*, 6(38) :32060–32069, March 2016.
- [385] Lifeng Dong, Colette M Witkowski, Michael M Craig, Molly M Greenwade, and Katherine L Joseph. Cytotoxicity Effects of Different Surfactant Molecules Conjugated to Carbon Nanotubes on Human Astrocytoma Cells. *Nanoscale Research Letters*, 4(12) :1517–1523, September 2009.
- [386] B Arechabala, Céline Couteau, P Rivalland, Laurence Coiffard, and Y Roeck-Holtzhauer. Comparison of cytotoxicity of various surfactants tested on normal human Fibroblast cultures using the neutral red test, MTT assay and LDH release. *Journal of applied toxicology : JAT*, 19 :163–5, May 1999.
- [387] Jennifer Kasper, Maria I. Hermanns, Christoph Bantz, Michael Maskos, Roland Stauber, Christine Pohl, Ronald E. Unger, and James C. Kirkpatrick. Inflammatory and cytotoxic responses of an alveolar-capillary coculture model to silica nanoparticles : Comparison with conventional monocultures. *Particle and Fibre Toxicology*, 8(1) :6, January 2011.
- [388] Sheau Wen Tsai, Ming Jung Jeng, Ruey Yug Tsay, and Yng Jiin Wang. Gel beads composed of collagen reconstituted in alginate. page 3.
- [389] Vahid Mansouri, Mohammad Salehi, Mir davood Omrani, Zahra Niknam, and Abdolreza Ardeshirylajimi. Collagen-alginate microspheres as a 3d culture system for mouse embryonic stem cells differentiation to primordial germ cells. *Biologicals*, 48 :114–120, July 2017.
- [390] Hugo Doméjean, Mathieu de la Motte Saint Pierre, Anette Funfak, Nicolas Atrux-Tallau, Kevin Alessandri, Pierre Nassoy, Jérôme Bibette, and Nicolas Bremond. Controlled production of sub-millimeter liquid core hydrogel capsules for parallelized 3d cell culture. *Lab on a Chip*, 17(1) :110–119, 2017.

- [391] Ta-Jen Wu, Hsiu-Hsuan Huang, Yuan-Ming Hsu, Shaw-Ruey Lyu, and Yng Jiin Wang. A novel method of encapsulating and cultivating adherent mammalian cells within collagen microcarriers. *Biotechnology and Bioengineering*, 98(3) :578–585, October 2007.
- [392] Satoru Yoshida, Masahiro Takinoue, and Hiroaki Onoe. Anisotropic spherical collagen microparticles for confined 3d cell culture system with spatially designed microenvironment. pages 263–266, January 2016.