



Micro-Usinage par laser femtoseconde : Fabrication d'une microfibre glomérulaire perfusée

Isabel Verit

► To cite this version:

Isabel Verit. Micro-Usinage par laser femtoseconde : Fabrication d'une microfibre glomérulaire perfusée. Médecine humaine et pathologie. Université de Bordeaux, 2020. Français. NNT : 2020BORD0159 . tel-03118545

HAL Id: tel-03118545

<https://theses.hal.science/tel-03118545>

Submitted on 22 Jan 2021

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 PRÉSENTÉE
POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

SPÉCIALITÉ : BIOLOGIE CELLULAIRE & PHYSIOPATHOLOGIE
DÉPARTEMENT : PHYSIQUE

Préparée au sein de l'unité INSERM U1026 BIOTIS, du Centre Technologique Optique et Lasers ALPhANOV et de l'Ecole Doctorale Sciences de la Vie et de la Santé

Par Isabel VÉRIT

Micro-usinage par laser femtoseconde : Fabrication d'une microfibre glomérulaire perfusée

SOUS LA DIRECTION DE :

Claire RIGOTHIER	Directrice de thèse	2017 – 2020
Laura GEMINI	Encadrante entreprise	2019 – 2020
Clémentine JAVAUX	Encadrante entreprise	2017 – 2018

Présentée et soutenue publiquement le 26 octobre 2020

Membres du jury :

M. MONNERET Serge	Université Aix-Marseille	Président du Jury
M. MORDON Serge	Université de Lille	Rapporteur
M. PAUTHE Emmanuel	Université de Cergy-Pontoise	Rapporteur
M. CHEVALIER JÉRÔME	INSA Lyon	Examineur
Mme AMÉDÉE Joëlle	Université de Bordeaux	Membre du jury invité
Mme. RIGOTHIER Claire	Université de Bordeaux	Directrice de thèse
Mme GEMINI Laura	ALPhANOV	Encadrante entreprise

Micro-usinage par laser femtoseconde :

Fabrication d'une microfibre glomérulaire perfusée

Le nombre de patients en attente sur la liste de transplantation d'organe est croissant dû notamment à une augmentation de la durée de vie. L'ingénierie tissulaire, dans une optique de remplacement d'organes pourrait être une alternative à ce problème de pénurie d'organes. Cependant, la création d'un organe entier par ingénierie tissulaire est limitée par la complexité de son organisation et la vascularisation des tissus créés. La vascularisation permet en effet d'apporter l'oxygène et les nutriments nécessaires aux cellules et d'éliminer les déchets qu'elles génèrent. Sans vascularisation, les cellules ne peuvent survivre et nécrosent.

Ce projet de thèse est un partenariat entre le laboratoire français BioTis - INSERM U1026 et le centre technologique d'optique et laser ALPhANOV autour de la bio-ingénierie tissulaire. L'objectif est de développer un procédé de fabrication et d'usinage pour créer un modèle de microfibres glomérulaires perfusables. Des microfibres cellulaires ont été réalisées au sein du laboratoire BioTis. Elles sont composées d'un cœur d'hydrogel de collagène et d'une paroi externe bicellulaire modélisant la barrière de filtration rénale. L'originalité de ce travail repose ensuite sur la création d'une lumière interne, à l'aide d'un faisceau laser à impulsions ultracourtes. Inspiré des procédés industriels d'usinages intravolumiques de matériaux transparents, les impulsions ultracourtes sont ici fortement focalisées dans le cœur de collagène pour créer un canal intravolumique via un phénomène de cavitation à l'intérieur des fibres sans impacter la couche externe de cellules.

Mots-clés : laser femtoseconde ; micro-usinage ; microfibres glomérulaires ; microvascularisation ; ingénierie tissulaire ; interaction laser-matière

Femtosecond laser micromachining :

Perfused glomerular microfibre manufacture

The demand for organ transplantation has rapidly increased during the past decades due to the increased incidence of vital organ failure and the greater improvement in post-transplant outcome. However, the unavailability of adequate organs for transplantation to meet the existing demand has resulted in major organ shortage crisis. Today, the emergence of regenerative medicine and more particularly, tissue engineering, appears as the best opportunity to effectively regenerate functional tissues and organs. However, these approaches face the 3D architectural complexity of a real organ's system. More particularly, one of the most challenging issues when engineering tissues is the lack of an efficient method to produce blood vessel systems — the vascularization. Without nutrients and oxygen supply, cells die, and engineered tissues show cell necrosis.

This project is a collaboration between the French laboratory of tissue engineering BioTis – INSERM U1026 and the technological centre in optics and lasers ALPhANOV. The aim of this project is to develop a model of perfusable glomerular microcapillary that would mimic glomerular filtration. Microfibres was crafted in the BioTis lab with a core made of collagen hydrogel and a peripheric cell bilayer. This thesis focuses on the creation of a channel within the collagen core using femtosecond laser processing. Following the principle of industrialized intra-volume laser microprocessing of transparent materials, ultra-short laser pulses were strongly focused inside collagen hydrogel to induce the formation of a channel through cavitation phenomena without affecting the cell bilayer.

Key-words : femtosecond laser ; micromachining ; glomerular microfibers ; microvascularization ; tissue-engineering ; laser-matter interaction

Remerciements

Ce manuscrit est le résultat d'un travail de trois ans porté par l'aide, le soutien et les précieux conseils de personnes s'étant retrouvées fortuitement ou non entre ma thèse et moi.

Je commence tout d'abord par remercier les membres du jury de m'accorder un peu de leur temps et de leur expertise dans cette dernière ligne droite avant de devenir (je l'espère) docteur. Je vous souhaite une bonne lecture.

J'aimerais ensuite remercier ma directrice de thèse, le docteur Claire Rigothier qui a toujours su se montrer disponible lorsque j'en avais besoin, malgré ses journées bien chargées, exerçant à la fois comme médecin, chercheur, enseignant et mère de famille. Je remercie aussi chaleureusement mes deux encadrantes à ALPhANOV. Merci à Laura Gemini, qui m'a prouvé que quoi qu'il arrive, on peut toujours trouver la force en soi pour continuer d'avancer, et avec le sourire ! Et merci à Clémentine Javaux de m'avoir accompagnée au tout début de ma thèse et de m'avoir soutenu pour monter cette station laser.

Cette thèse n'aurait pas été possible sans le soutien financier de l'ANRT. Je remercie également Benoît Appert-Collin et Jean-Christophe Fricain qui m'ont tous deux ouvert les portes de leur établissement et m'ont m'accueillie au sein du Centre Technologique ALPhANOV et du laboratoire BioTis, ainsi que Rainer Kling et Raphaël Devillard qui m'ont fait confiance pour mener ce projet à bien et naviguer entre les deux mondes de la photonique et de la biologie cellulaire.

Pendant 3 ans, j'ai reçu l'aide inestimable d'internes en néphrologie et pharmacie ayant travaillé sur le projet. Merci pour votre aide et d'avoir été des collègues adorables qui ont rendu les moments passés en culture cellulaire plus faciles et agréables : Pauline, Julie, Pierre, Hugo et Stan. Merci aussi à Béatrice Lazoux, pour tes nombreux conseils, tes nombreuses connexions en pharmacie et pour toutes ces idées que tu nous partages en réunion.

Je souhaiterais remercier également toute l'équipe d'ALPhANOV qui m'a accueillie comme une famille pendant ces 3 années. Même si l'équipe MUL est très clairement la meilleure ! J'ai énormément appris à vos côtés tout en passant de très bons moments. J'adresse un remerciement tout particulier à Baptiste et Bastien pour m'avoir pris sous leurs ailes à mon arrivée, de m'avoir formée à l'usinage laser tout en étant de très bons colocs de bureau. Merci à Marc pour m'avoir montré à quoi ressemble un excellent manager. Merci à Alice pour nos discussions et pour avoir tenté de répondre à mes questions sur des détails d'il y a plus de trois ans. Merci également à Kévin et Germain qui ont partagé leurs expériences et conseils de thésard. Merci à Donetsi pour ta gentillesse et l'impression de la puce. Merci à l'équipe Système et l'équipe Lasers pour m'avoir concocté un poste laser au poil (Adèle, Hugo,

Matthieu, Lucie, Emmanuel). Et un grand merci à Charles-Henri pour m'avoir fait partager sa passion de la microscopie non-linéaire.

J'ai également eu la chance d'être très bien accueillie au sein de l'équipe BioTis malgré mes passages en coup de vent pendant ces trois ans. Alors merci à vous tous et à l'équipe des jeunes de BioTis. Je n'arrive toujours pas à comprendre comment il est possible d'avoir une équipe si gentille et qui intègre tout le monde.

Je remercie également le laboratoire de Technologie Pharmaceutique Industrielle de Bordeaux et plus particulièrement le Pr. Lemagnen pour les mesures réalisées chez eux et les discussions intéressantes.

Merci au Bordeaux Imaging Center, pour les supers formations en microscopie, en traitement d'images et de m'avoir aidé à calculer le volume de toutes ces bulles de cavitation.

Je souhaite également remercier mon vieux vélo qui n'a jamais failli lors de nos nombreux allers-retours que nous avons faits ensemble entre ALPhANOV et BioTis, ainsi que tout le personnel du réseau de transport bordelais qui a su prendre brillamment le relais les jours de pluie et de forte chaleur.

Enfin, il est important de remercier tout le soutien extérieur sans qui, la personne stressée que je suis, ne serais jamais allé au bout de ce travail :

Merci à l'équipe bordelaise de m'avoir accueillie et fait aimer Bordeaux : Ben, Alex, Maylis, Matthieu, Pierre, Flo, Marine. Merci à la vielle équipe barthousienne car vous êtes toujours là plus de dix ans après : Maylis, Marion, Romain, Gaétan et Sophie. Merci à ma famille qui ne comprend pas ce que je fais mais me soutient quand même. Merci Maman pour la relecture et les appels téléphoniques. Merci Ludo pour m'avoir offert la chance de chanter sur scène et d'avoir apporté la musique au travail. Merci à la coloc'scopie à qui je dédie ma victoire de ma thèse en 180 secondes : Wiwi, Seb, Zazoo, Noémie. Vous êtes les meilleurs tout simplement (en même temps Seb gagne toujours) !

Et merci Thibault pour ta patience, ton sourire et tes bons petits plats.

Table des matières

Remerciements	3
Table des matières	5
Table des figures	8
Table des tableaux	12
Introduction et organisation générale	14

CHAPITRE I - Contexte et Etat de l'art

I. Insuffisance rénale	18
I.1. ANATOMIE RENALE ET PRESENTATION DU GLOMERULE.....	18
I.1.1. Les cellules endothéliales glomérulaires (CEG)	19
I.1.2. La membrane basale glomérulaire	19
I.1.3. Les podocytes	20
I.2. INSUFFISANCE RENALE CHRONIQUE	20
I.2.1. Définition	20
I.2.2. Suppléance des fonctions rénales et leurs limitations	21
I.2.3. Les enjeux de la recherche	21
I.3. MODELES EXPERIMENTAUX EN NEPHROLOGIE	22
I.3.1. Les modèles murins in vivo	22
I.3.2. Les modèles cellulaires in vitro	22
II. Ingénierie tissulaire.....	23
II.1. INTRODUCTION A L'INGENIERIE TISSULAIRE	23
II.1.1. Définition	23
II.1.2. Principaux enjeux de l'ingénierie tissulaire	24
II.2. LA VASCULARISATION	24
II.2.1. Problème de vascularisation des tissus issus de l'ingénierie tissulaire	24
II.2.2. Stratégies de vascularisation des tissus bioconstruits.....	26
II.2.3. Fabrication 3D de vaisseaux et de réseaux vasculaires	27
II.3. INGENIERIE TISSULAIRE APPLIQUEE AU REIN.....	32
II.3.1. Les organoïdes	32
II.3.2. Techniques de bioimpression	33
II.3.3. Kidney on-a-chip	34
II.3.4. Utilisation d'une structure de soutien (scaffold)	35
II.4. FABRICATION DE MICROFIBRES D'HYDROGEL CHARGEES EN CELLULES	36
III. Interaction laser-matière.....	37
III.1. UTILISATION DES LASERS POUR LE BIOMEDICAL	37
III.2. PRINCIPES PHYSIQUES DU MICRO-USINAGE PAR LASER DE TISSUS MOUS ET TRANSPARENTS	38
III.2.1. Principe de l'absorption multiphotonique	39
III.2.2. Cavitation induite par laser.....	42
III.3. APPLICATIONS A L'USINAGE DE CANAUX INTRAVOLUMIQUES DANS LES HYDROGELS.....	43
III.3.1. Usinage d'hydrogels synthétiques ou dérivés de protéines animales ou végétales	44
III.3.2. Usinage d'hydrogels présent dans la matrice extracellulaire.....	45
III.4. VIABILITE CELLULAIRE LORS DE L'USINAGE DES HYDROGELS.....	52

CHAPITRE II - Mise au point des protocoles expérimentaux

I. Modèle d'étude de l'interaction laser-hydrogel	57
I.1. FABRICATION D'UN MODELE D'ETUDE.....	57
I.1.1. Pourquoi utiliser un modèle d'étude ?	57
I.1.2. Cahier des charges	58
I.1.3. Les essais.....	58
I.1.4. Choix du modèle final	63
I.2. LE MODELE FINAL ET SES CARACTERISTIQUES	65
I.2.1. Caractéristiques générales et dimensions	65
I.2.2. Spectre d'absorption de l'hydrogel de gélatine	65
I.2.3. Rhéologie de l'hydrogel de gélatine	66
I.3. DEROULEMENT DE L'USINAGE DES BLOCS D'HYDROGEL DE GELATINE.....	68
I.4. CARACTERISATION DES BLOCS DE GELATINE USINES.....	68
II. Fabrication, caractérisation et usinage des microfibres	69
II.1. FABRICATION DE LA FIBRE	69
II.1.1. Protocole de culture cellulaire.....	69
II.1.2. Protocole de fabrication des microfibres	70
II.2. CARACTERISATION DES MICROFIBRES ET DU CŒUR DE COLLAGENE	71
II.2.1. Caractéristiques générales et dimensions	71
II.2.2. Différenciation cellulaire et membrane de filtration glomérulaire	72
II.2.3. Viabilité cellulaire avant usinage	74
II.2.4. Propriétés physiques du collagène	75
II.3. USINAGE DES MICROFIBRES	79
II.3.1. Support échantillon	79
II.3.2. Déroulement de l'usinage.....	86
II.4. CARACTERISATION DES MICROFIBRES USINEES	87
II.4.1. Marquage Live/Dead®	87
II.4.2. Imagerie au microscope confocal	87
II.4.3. Marquage DAPI	88
III. Station d'usinage laser	88
III.1. CHOIX DE LA SOURCE LASER	90
III.1.1. Choix de la durée d'impulsion	91
III.1.2. Choix de la longueur d'onde.....	92
III.1.3. Source laser utilisée	94
III.2. PRESENTATION DE LA LIGNE OPTIQUE	95
III.2.1. Description de la ligne optique	95
III.2.2. Choix du système de focalisation	97
III.3. SYSTEME D'IMAGERIE EN LUMIERE BLANCHE	97
III.4. MISE AU POINT D'UN SYSTEME D'IMAGERIE DU COLLAGENE EN SHG	98
III.4.1. Pourquoi utiliser un second système d'imagerie ?.....	98
III.4.2. Principe de la SHG.....	98
III.4.3. Dispositif expérimental	100

CHAPITRE III - Micro-usinage dans le volume d'un hydrogel de gélatine par laser femtoseconde

I. Biofabrication of a vascular capillary by ultra-short laser pulses	103
I.1. PRESENTATION DU PREMIER ARTICLE	103
I.2. L'ARTICLE	103

I.3. DISCUSSION.....	112
I.3.1. Influence de la profondeur de focalisation laser (D)	112
I.3.2. Influence de l'énergie cumulée (Fluence, F, et Nombre de passages laser, N).....	112
I.3.3. Adaptation des paramètres lasers à l'usinage des microfibres.....	113
I.3.4. Viabilité cellulaire après usinage	113
I.4 CONCLUSION	113
II. Intra-volume processing of gelatine hydrogel by femtosecond laser-induced cavitation.....	114
II.1. PRÉSENTATION DE L'ARTICLE.....	114
II.2. L'ARTICLE	115
II.3. DISCUSSION.....	126
II.3.1. Mécanismes de formation des canaux et de dégradation de la gélatine	126
II.3.2. Propriétés rhéologiques de l'hydrogel de gélatine	127
II.4. CONCLUSION	127
III. Conclusion des deux articles	128
 CHAPITRE IV - Micro-usinage d'un hydrogel de collagène à l'intérieur de microfibres cellularisées par laser femtoseconde	
I. Travaux préliminaires.....	132
I.1. CREATION D'UN CANAL SUR FIBRES FIXEES AU PFA 4 %	132
I.2. PREMIERS ESSAIS SUR FIBRES VIVANTES.....	132
II. Influence des paramètres lasers pendant l'usinage	133
II.1. INFLUENCE DE LA PROFONDEUR DE TIR.....	134
II.1.1. Influence de la profondeur de tir juste après l'interaction laser	134
II.1.2. Influence de la profondeur de tir 24 h après l'interaction laser	136
II.2. INFLUENCE DE LA FLUENCE.....	137
II.2.1. Influence de la fluence juste après l'interaction laser.....	137
II.2.2. Influence de la fluence 24 h après l'interaction laser.....	138
II.3. INFLUENCE DU NOMBRE DE PASSAGE LASER	140
II.3.1. Influence du nombre de passage laser juste après l'interaction laser	140
II.3.2. Influence du nombre de passage laser 24 h après l'interaction laser.....	141
II.4. INFLUENCE DES EFFETS THERMIQUES : CADENCE DE TIR ET RECOUVREMENT	144
II.4.1. Influence de la cadence et de la dose juste après l'interaction laser.....	144
II.4.2. Influence de la cadence et de la dose 24 h après l'interaction laser	145
III. Paramètres extérieurs influençant l'usinage laser	146
III.1. INFLUENCE DE L'HYDRATATION SUR LA VIABILITE CELLULAIRE	146
III.2. INFLUENCE DE LA VIABILITE CELLULAIRE SUR LA QUALITE DE L'USINAGE LASER	150
III.3. INFLUENCE DE L'ÉPAISSEUR DES FIBRES SUR L'USINAGE LASER	154
IV. Discussion	155
Conclusion générale	159
Perspectives.....	161
ANNEXES	163

Table des figures

Figure 1 Schéma de principe de l'usinage d'une microfibre par laser fs. Le laser traverse la couche cellulaire externe de la fibre sans l'endommager pour détruire le collagène (en vert) à l'intérieur par interactions photoniques non linéaires.....	15
Figure 2 Schéma d'un néphron avec le glomérule impliqué dans la production d'urine primitive. Les flèches vertes montrent l'élimination des toxines par le glomérule rénal vers le tube contourné proximal.	18
Figure 3 Schématisation de la membrane de filtration glomérulaire. Les podocytes et leur prolongement sont en rose, la membrane basale glomérulaire en bleu et l'endothélium fenestré en jaune.....	19
Figure 4 Description schématique de la limite de diffusion dans les systèmes vasculaires in vivo. Les tissus environnants sont approvisionnés en oxygène, nutriments et médicaments via un réseau dense de capillaires. Le CO ₂ et les déchets cellulaires sont également éliminés par le réseau vasculaire [25].	25
Figure 5 Un réseau vasculaire sacrificiel bioimprimé est encapsulé d'une solution d'hydrogel et de cellules puis dissous pour permettre la création d'une architecture vasculaire perfusable [35].	28
Figure 6 Schéma de principe du LIFT [36].	29
Figure 7 Photo et schéma du système de triple flux coaxial permettant de fabriquer des fibres d'hydrogel chargées en cellules et entourées d'une gaine d'alginate réticulée. Barre d'échelle : 1mm [51].	32
Figure 8 Schéma d'un glomérule sur puce [61].	34
Figure 9 Diagramme de Jablonski illustrant les principes de l'absorption linéaire.	39
Figure 10 Diagramme de Jablonski illustrant les principes de l'absorption non linéaire.	40
Figure 11 Schéma illustrant un objectif focalisant avec une forte ouverture numérique. Ici, D représente le diamètre de la pupille d'entrée, f est la distance de focalisation de l'objectif, α est l'angle de demi-ouverture et n_{air} est l'indice de réfraction du milieu.....	41
Figure 12 Une impulsion femtoseconde focalisée avec une grande optique numérique permet d'usiner le volume d'un matériau transparent (ici le collagène) sans impacter les couches supérieures (ici la surface cellulaire).	42
Figure 13 A) Schéma de la triple hélice de collagène formant une molécule de tropocollagène. B) Organisation spatiale du collagène fibrillaire, de la molécule au tissu [96].	46
Figure 14 Structure A) fibrillaire du collagène de type I et B) en réseau du collagène de type IV.	47
Figure 15 Spectre d'absorption de différents chromophores présents dans les tissus humains entre 100 nm et 10 μ m (en échelle logarithmique). Le spectre du collagène apparaît en vert et celui de l'eau en bleu ciel [100].	48
Figure 16 Spectre d'absorption du collagène I entre 600 et 1100 nm [101].	49
Figure 17 A) Des nanobaguettes d'or sont insérées à l'intérieur d'un bloc de collagène pour augmenter localement l'absorption afin de réaliser des canaux intravolumiques avec un laser proche IR. B) Photo et image en microscopie en lumière blanche du gel après usinage [103].	50
Figure 18 Spectre d'absorption de la gélatine entre 400 et 1300 nm [107].	51
Figure 19 Viabilité cellulaire 12h après la disruption de la membrane cytoplasmique par laser. La viabilité cellulaire est significativement améliorée avec un laser fs (absorption à 2 photons) par rapport à un laser ns (absorption à 1 photon). En revanche lorsque la puissance est augmentée pour observer la disruption de la membrane dans 90 % des cas (contre 50 %) la viabilité n'est presque pas affectée [109].	54
Figure 20 Bulles de cavitation formées par usinages laser fs A) dans un hydrogel de collagène de type I au centre d'une microfibre et B) dans le volume d'un bloc de gélatine à 2 % à 100 μ m de profondeur. Photos prises par caméra CCD 5 secondes après usinage.....	64
Figure 21 Spectre d'absorption de l'hydrogel de gélatine à 2 % (en bleu) et de son solvant, l'eau distillée (en orange) entre 180 et 1300 nm. La longueur d'onde d'usinage utilisée pour l'ensemble des expériences de ce manuscrit est indiquée par des pointillés rouges (1030 nm).	66
Figure 22 Evolution de la viscosité (en cP) de l'hydrogel de gélatine à 2 % selon un cycle d'hystérésis. Les contraintes de cisaillements sont augmentées en accélérant la rotation du mobile de mesure par pallier de 5 rpm toutes les 3 minutes entre 5 et 20 rpm puis en ralentissant le mobile pour revenir à une vitesse de 5 rpm.	67
Figure 23 Procédé de fabrication d'une microfibre. A : Création d'une gaine d'alginate autour d'un capillaire de verre. B : Injection de la solution collagène/CEG en retirant simultanément le capillaire. C : Après 18h d'incubation et migration des CEG vers la périphérie retrait de la gaine d'alginate.	70

Figure 24 Structure cœur-écorce d'une microfibre glomérulaire. Le centre est composé d'un hydrogel de collagène de type I entouré de CEG puis de podocytes. La membrane basale glomérulaire est située à l'interface des deux types cellulaires. A : Coupe longitudinale. B : Coupe transversale. C : Photo d'une microfibre prise en microscopie optique classique [111].	72
Figure 25 Mise en évidence par Western Blot des marqueurs de différenciation spécifique des cellules endothéliales (VEGFR) et ceux des podocytes (Néprine et Synaptopodine) [67, 112].	73
Figure 26 Microfibre prise au microscope confocal après immunomarquage. A) Marquage DAPI des noyaux cellulaires, B) Expression du marqueur PECAM-1 par les CEG, C) Expression de la podocine par les podocytes et D) Fusion des trois images. Chaque image correspond à l'empilement des valeurs maximales de chacune des coupes 2D [67, 113].	73
Figure 27 PCR et PCR quantitative du collagène IV- $\alpha 5$, de la laminine et du nidogène dans un modèle de coculture et dans une microfibre. La néoformation de la membrane basale glomérulaire est possible dans le modèle 3D des fibres mais pas dans les modèles 2D de coculture [67, 112].	73
Figure 28 Coupe longitudinale d'une microfibre après marquage Live/Dead® révélé au microscope confocal. Le signal vert indique la présence de cellules viables entourant le cœur de collagène (non fluorescent). Aucune perte de viabilité n'est observée (absence de signal rouge).	75
Figure 29 Spectre d'absorption de l'hydrogel de collagène à 5 mg/mL (en vert) et de son diluant, l'eau distillée (en rouge) entre 180 et 1300 nm. La longueur d'onde d'usinage utilisée pour l'ensemble des expériences est indiquée par des pointillés rouges (1030 nm).	76
Figure 30 Spectres d'excitation (trait plein) et d'émission (pointillé) de la solution d'hydrogel de collagène diluée à 1/1000 entre 200 et 550 nm pour une émission fixée à 370 nm et une excitation fixée à 285 nm respectivement.	77
Figure 31 Couple des spectres d'excitation (trait plein) et d'émission (pointillé) de la solution d'hydrogel de collagène diluée à 6/1000 et 14/1000 respectivement en orange et en rouge entre 260 et 530 nm pour une émission fixée à 435 nm et une excitation fixée à 350 nm respectivement. Le couple excitation/émission de l'eau est également tracé en bleu à titre de comparaison.	78
Figure 32 Usinage d'une microfibre placée sur une lame de verre. Le tir laser focalisé au centre de la fibre (A) a percé la paroi cellulaire (B).	80
Figure 33 Formation de bulles de cavitation après usinage laser à l'intérieur d'une fibre hydratée dans une boîte de Petri inondée de PBS 1X. Photo prise sur l'une des rares fibres retrouvées lors de ces essais.	80
Figure 34 Gravure laser sur la surface cellulaire d'une microfibre déposée sur Parafilm®.	81
Figure 35 Support échantillon imprimé en PLA contenant un sillon central pour maintenir la fibre, une lamelle de verre en guise de couvercle et un corps ouvragé pour laisser passer le milieu de culture.	81
Figure 36 Support échantillon constitué d'une plaque en inox contenant des microperforations et saturée en milieu de culture.	82
Figure 37 Viabilité cellulaire de deux microfibrilles posées sur un support en inox perforé et saturé en milieu de culture (en haut) et une boîte de Petri recouverte d'un fond d'agarose avec quelques gouttes de milieu (en bas). La viabilité cellulaire est évaluée à t0 juste avant de déposer la fibre sur le support et après 20 minutes passées sur le support dans une salle à 21 °C.	83
Figure 38 Test de viabilité cellulaire d'une microfibre plongée dans 3mL d'EGM2 à air libre dans une salle non stérile à 21°C pendant 6 heures. La viabilité cellulaire est évaluée à t0 avant de sortir la fibre de l'incubateur est après 6 heures passées à 21°C dans une salle non stérile.	84
Figure 39 Capture d'écran du logiciel de la caméra CCD juste avant l'usinage. Le réticule (en jaune) est préalablement aligné avec le point focal laser puis il est ensuite positionné dans le cœur de la fibre au niveau du point de départ de la trajectoire à usiner. La flèche rouge représente la trajectoire du premier usinage dont les coordonnées de déplacement sont ensuite traduites en G-Code (voir Annexe 3).	86
Figure 40 Schéma de principe du microscope confocal à balayage [115].	87
Figure 41 Schéma de la station d'usinage composée d'une source laser, d'une ligne optique et d'un jeu de platines XYZ supportant le système de visualisation des échantillons (objectif + caméra + éclairage).	89
Figure 42 Photographie de la station d'usinage laser dans les locaux d'ALPhANOV. La trajectoire de la source laser jusqu'à l'échantillon est tracée en rouge. Les lettres en blanc représentent : a) la source laser, b) le couple lame demi-onde + polariseur, c) l'agrandisseur de faisceau, d) l'objectif de focalisation et e) les platines de translation horizontale sur lesquelles repose l'échantillon.	90

Figure 43 Spectres d'absorption du sang et de l'eau oxygénée en fonction de la longueur d'onde. Données compilées par Jacques (2013) [117]. Le nom des auteurs de chaque courbe est indiqué dans les encadrés.	92
Figure 44 Spectres d'absorption de la mélanine et de la graisse en fonction de la longueur d'onde. Données compilées par Jacques (2013) [117].	93
Figure 45 Exemple de la différence de pénétration de la lumière dans la peau en fonction de la longueur d'onde. Les longueurs d'ondes entre 600 et 1200 nm pénètrent les tissus plus profondément [69, 118].	93
Figure 46 Une impulsion femtoseconde focalisée avec une grande optique numérique permet d'usiner le volume de d'hydrogel de collagène transparent au proche IR sans impacter la surface cellulaire.	94
Figure 47 Schéma de principe d'un cube séparateur de faisceau. Un cube séparateur de faisceau est un miroir semi réfléchissant qui sépare le faisceau incident en un faisceau transmis (polarisation P) et un faisceau réfléchi (polarisation S) en fonction de la polarisation incidente.	95
Figure 48 Schéma de principe illustrant le recouvrement entre deux impulsions successives. Durant l'usinage, seul les platines se déplacent tandis que le faisceau laser reste fixe. Sur le schéma, la première impulsion déposée est donc celle de droite et la dernière impulsion est celle le plus à gauche.	96
Figure 49 Diagramme de Jablonski illustrant le principe de SHG. Lorsqu'une molécule reçoit simultanément deux photons incidents cohérents et de même énergie, la molécule diffuse immédiatement l'énergie (10^{-16} s) sous la forme d'un seul photon d'énergie double sans échanger d'énergie avec le milieu environnant [120].	99
Figure 50 A l'aide d'un miroir flip-flap, le faisceau laser est dirigé vers une $\lambda/2$ et un cube polariseur divisant le faisceau entrant en 2 faisceaux sortants : un de faible puissance pour imager le signal SHG du collagène et le second de forte puissance pour usiner le cœur de collagène des microfibres. Sur le schéma, un beam block est placé sur le trajet de la ligne d'imagerie (en pointillé), seul le faisceau d'usinage passe. Les deux lignes se rejoignent ensuite à l'aide d'un autre cube polariseur. Le microscope étant placé sur une table amovible, le périscope et les iris permettent de régler parfaitement l'alignement du faisceau laser à travers les différentes optiques.	101
Figure 51 Reconstruction de plusieurs prises de vues en microscopie confocale d'une microfibre fixée au PFA et usinée par laser fs. En bleu, marquage DAPI des noyaux cellulaires, en vert : autofluorescence du collagène [125].	132
Figure 52 Image d'une microfibre placée sur une lame de verre avant et après usinage laser.	133
Figure 53 Schéma illustrant la profondeur du point focal D à l'intérieur d'une microfibre de 200 μm de diamètre. Lorsque le point focal laser est ciblé sur la surface de la fibre, $D = 0 \mu\text{m}$	134
Figure 54 Tirs lasers successifs réalisés sur différentes fibres avec variation de la profondeur du point focal. ..	135
Figure 55 Tirs lasers successifs réalisés à l'intérieur d'une même fibre pour différentes valeurs de fluence : 19,6 ; 31,9 ; 34,4 et 36,8 J/cm^2 . Les images du haut représentent le cœur de la microfibre où les bulles se forment. Les images du bas montrent pour chaque fluence l'état de la paroi cellulaire après usinage. Les flèches blanches indiquent la présence de dommage sur la paroi cellulaire.	138
Figure 56 Photographies d'une même fibre prise après chaque passage laser successif, de $N = 1$ à $N = 4$, avec des paramètres lasers identiques. Les flèches blanches illustrent un exemple de fusion de deux bulles après plusieurs passages laser.	140
Figure 57 Fibres usinées avec 2 passages laser. Chacune des images montre les bulles de cavitation formées 5 secondes après chaque passage laser (pour $N = 1$ et $N = 2$) avec les mêmes paramètres.	141
Figure 58 Marquages Live/Dead® appliqués sur trois fibres différentes et usinées avec les mêmes paramètres lasers mais un nombre de passage différents. A gauche : $N = 3$; au centre : $N = 5$; à droite : $N = 7$	142
Figure 59 À gauche : Affaiblissement de la densité de signal dans le cœur de collagène d'une fibre vivante après $N = 3$. Les couleurs ont été modifiées pour visualiser l'impact laser. Le vert correspond aux cellules viables tandis que le rouge est surexprimé afin d'observer le signal de fluorescence provenant de la matrice extracellulaire. À droite : Couleurs non modifiées. Image attestant de la bonne viabilité cellulaire de la microfibre après usinage.	143
Figure 60 À gauche : Canal très fin et très net à l'intérieur de la microfibre pour $N = 3$. Le signal rouge est augmenté afin d'observer la fluorescence de la matrice extracellulaire. À droite : Affaiblissement du signal vert autour du canal.	143
Figure 61 Tirs lasers successifs réalisés sur différentes fibres à 10 kHz (en haut) et 50 kHz (en bas) pour trois valeurs de recouvrement différentes : 99,7 % (à gauche), 98,5 % (au centre) et 96,9 % (à droite).	144

Figure 62 Marquages Live/Dead® appliqués sur quatre fibres différentes usinées à 10 kHz (en haut) et 50 kHz (en bas) pour deux valeurs de recouvrement différentes : 99,7 % (à gauche) et 98,5 % (à droite).	146
Figure 63 Histogramme montrant le pourcentage de microfibres toujours vivantes après 24 h pour le groupe des microfibres usinées, le groupe des microfibres contrôles du support échantillon et le groupe des microfibres contrôles restées immergées dans du milieu de culture.	148
Figure 64 Histogramme montrant le pourcentage de microfibres toujours vivantes après 24h en fonction du temps passé sur le support échantillon avec une faible quantité de milieu de culture pour le groupe des microfibres usinées par laser et le groupe des microfibres contrôles du support échantillon.	149
Figure 65 Images L/D® de microfibres dont le signal vert couvre 20 % et 2 % de la surface totale de la fibre. ..	150
Figure 66 Différence d'interaction laser à l'intérieur de deux microfibres. A) Canal net à l'intérieur d'une fibre déshydratée après un usinage de 41 minutes. B) Atténuation de la densité de signal rouge à l'intérieur de la matrice à l'intérieur d'une fibre viable après un usinage de 9 minutes. Pour mettre en évidence la présence de perte de signal de l'image B, les couleurs L/D® ont été modifiées et un cercle bleu entoure la zone d'intérêt. ..	150
Figure 67 Evolution d'une bulle de cavitation à l'intérieur d'une microfibre après la fin de l'usinage. Les temps indiqués dans les encarts de chaque image correspondent au temps écoulé depuis la fin de l'usinage laser. ...	151
Figure 68 Signal de SHG du collagène de type I avant (à gauche) et après (à droite) l'usinage pour 2 fibres différentes. En haut : la fibre est restée suffisamment hydratée pour permettre la formation de bulles de cavitation (flèche blanche). En bas : la fibre est restée trop longtemps sur le support échantillon avant d'être usinée, une diminution nette du signal de SHG est observée le long de la trajectoire d'usinage.	152
Figure 69 Signal de SHG du collagène I quelques secondes après l'usinage pour une même fibre. Pendant les 10 premières secondes, une bulle de cavitation grossit à l'intérieur du collagène. Après 10 secondes, le grossissement de la bulle a entraîné une rupture de la paroi cellulaire (non photographié). 20 secondes après, on retrouve une atténuation du signal de collagène à l'endroit où la bulle s'est formée.	153
Figure 70 Schéma illustrant les différentes profondeurs d'usinage pour une microfibre de 200 µm de diamètre. Le cône rouge dégradé schématise la valeur de la fluence avant et après focalisation. Plus on s'éloigne du centre de focalisation, plus la fluence diminue.	156

Table des tableaux

Tableau 1 : Caractéristiques principales des 2 types de collagène mentionnés dans cette thèse : le collagène de type I et le collagène de type IV. Les chaînes $\alpha 1$ et $\alpha 2$ sont des chaînes d'acide aminés constituées majoritairement de Glycine et de Proline.	47
Tableau 2 : Bilan des quatre modèles développés. La présence d'une coche verte et d'une croix rouge indique respectivement lorsque le critère est respecté ou non par le modèle. Lorsque le modèle ne remplit que partiellement l'un des critères, un $\pm$ bleu est indiqué. La pertinence du modèle est évaluée vis-à-vis du comportement des bulles observées lors de l'usinage.	65
Tableau 3 : Avantages et inconvénients des différents supports échantillons testés. Les deux dernières lignes du tableau, surligné en rouge, indiquent les critères rédhibitoires pour l'utilisation de ces supports. Une coche verte et une croix rouge sont respectivement indiquées lorsqu'une condition est remplie ou non par le support. Un point d'interrogation bleu est indiqué pour le support n°4 pour lequel aucune fibre n'a pu être usinée.	85
Tableau 4 : Pourcentage de microfibres usinées en fonction du type de modification laser observée (présence d'une atténuation du signal central, endommagement de la surface extérieure, pas d'interaction visible) vis-à-vis de la profondeur du point focal laser à l'intérieur de la fibre pendant l'usinage. Profondeurs étudiées : $D = 30 \mu\text{m}$, $D = 50 \mu\text{m}$, $D = 100 \mu\text{m}$ et $D = 140 \mu\text{m}$	136
Tableau 5 : Pourcentage de microfibres viables ou non viables après usinage laser en fonction de la fluence laser pour $RR = 50 \text{ kHz}$, $OL = 99,7 \%$, $D = 100 \mu\text{m}$ et $N = 1$	139
Tableau 6 : Pourcentage de microfibres usinées en fonction du type de modifications laser observé (présence d'une atténuation du signal au centre de la microfibre, endommagement de la surface externe, aucune interaction visible) vis-à-vis de la fluence appliquée.	139
Tableau 7 : Tableau décrivant le type d'interactions observées après usinage des microfibres par usinage laser à 10 kHz et 50 kHz pour deux valeurs de recouvrement différentes : $98,5 \%$ et $99,7 \%$. Analyse réalisée sur 2 fibres pour chaque jeu de paramètres.....	145
Tableau 8 : Répartition du nombre de fibres usinées selon la présence ou l'absence d'une interaction laser après usinage et en fonction du diamètre de la microfibre.	154

Notations et abréviations

Grandeurs physiques

D	profondeur de tir <i>i.e.</i> profondeur du point focal depuis la surface de l'échantillon (Depth) (μm)
F	fluence, <i>i.e.</i> énergie par unité de surface (J/cm^2)
N	nombre de passages laser
OL	taux de recouvrement (OverLap) (%)
RR	cadence laser <i>i.e.</i> fréquence impulsionnelle (Repetition Rate) (Hz)
ON	ouverture numérique d'un objectif de focalisation
d	distance entre deux impulsions lasers successives (μm)

Notations grecques

λ	longueur d'onde du faisceau laser (nm)
$\varnothing_{\text{foc}}$	diamètre du faisceau laser au point de focalisation (μm)

Abréviations

AMP	absorption multiphotonique
CEG	cellule endothéliale glomérulaire
ECM	matrice extracellulaire (ExtraCellular Matrix)
IR	infrarouge
IRC	insuffisance rénale chronique
L/D [®]	Live/Dead [®]
LIFT	technique de bioimpression 3D par laser (Laser Induced Forward Transfer)
LIPSS	structures périodiques induites par laser (Laser-Induced Periodic Surface Structures)
MBG	membrane basale glomérulaire
NIR	proche infrarouge (Near InfraRed)
PBS	tampon phosphate salin (Phosphate-Buffered Saline)
PCR	réaction en chaîne par polymérase (Polymerase Chain Reaction)
PEGDA	diacrylate de polyéthylène glycol
SHG	génération de seconde harmonique (Second Harmonic Generation)
UV	ultraviolet
WB	Western Blot

Introduction et organisation générale

Le rein assure l'élimination des toxines de notre sang. L'atteinte progressive de ses fonctions de filtration conduit à une insuffisance rénale chronique (IRC). Aujourd'hui, avec le vieillissement de la population et l'augmentation du nombre de patients présentant un diabète et/ou une hypertension artérielle, l'IRC touche près de 10 % de la population française [1]. Lorsque l'IRC arrive à un stade avancé, le dysfonctionnement des reins doit être pallié par une méthode de suppléance rénale : hémodialyse ou dialyse péritonéale¹, et transplantation rénale. Alors que la dialyse expose les patients à une morbi-mortalité² importante, la greffe permet une meilleure qualité de vie et une plus grande espérance de vie mais expose à de nombreuses complications infectieuses ou cardiovasculaires. De plus, le manque de greffons disponibles limite fortement le nombre de patients receveurs [2].

Pour ralentir la progression des maladies rénales et amener un jour le patient vers la guérison par des thérapies spécifiques, il est nécessaire d'étudier et de comprendre les mécanismes physiopathologiques induisant ces maladies. Les mécanismes de genèse et de progression de ces maladies sont aujourd'hui modélisés à l'aide de modèles expérimentaux *in vitro* ou *in vivo* qui peinent à reproduire la complexité des mécanismes rénaux. Pour réussir à comprendre la richesse de ces mécanismes physiopathologiques et élaborer un traitement, les modèles utilisés doivent être améliorés.

Ainsi, nous souhaitons développer un modèle expérimental *in vitro* de microfibres glomérulaires. Les microfibres glomérulaires composées de cellules issues du glomérule sont fabriquées selon un procédé développé au sein du laboratoire BioTis. Ce procédé de fabrication aboutit à une microfibre de type cœur-écorce dont l'écorce est constituée d'une couche bicellulaire modélisant la barrière de filtration rénale et dont le cœur est rempli de collagène. Le verrou technologique de ce protocole de fabrication est la création d'une lumière interne en éliminant le collagène à l'intérieur de la microfibre pour pouvoir ensuite la perfuser. Ce sujet de thèse consiste à lever ce verrou technologique en utilisant un laser à impulsions ultracourtes pour créer un canal intravolumique à l'intérieur du collagène central sans endommager le reste du microcapillaire. Le schéma de principe de l'expérience est visible sur la Figure 1.

¹ La dialyse est une technique médicale permettant d'épurer le sang d'un patient artificiellement soit à l'extérieur de l'organisme à l'aide d'une machine équipée d'une membrane artificielle de filtration (hémodialyse) soit à l'intérieur de l'organisme en utilisant une membrane entourant les organes de la cavité abdominale (dialyse péritonéale).

² La morbi-mortalité représente le nombre de personne malade cumulé avec le nombre de personne décédées pour une pathologie donnée, au sein d'une population donnée et pendant une période donnée. Elle donne ainsi une indication sur les facteurs de risque pour une pathologie.

Mon travail s'est concentré sur la mise en place d'un protocole expérimental permettant de réaliser l'usinage du collagène dans le volume des microfibres à l'aide d'un laser femtoseconde puis sur la compréhension des phénomènes physiques d'interaction laser-collagène et laser-cellules intervenant lors de la dégradation du collagène par laser ultracourt.

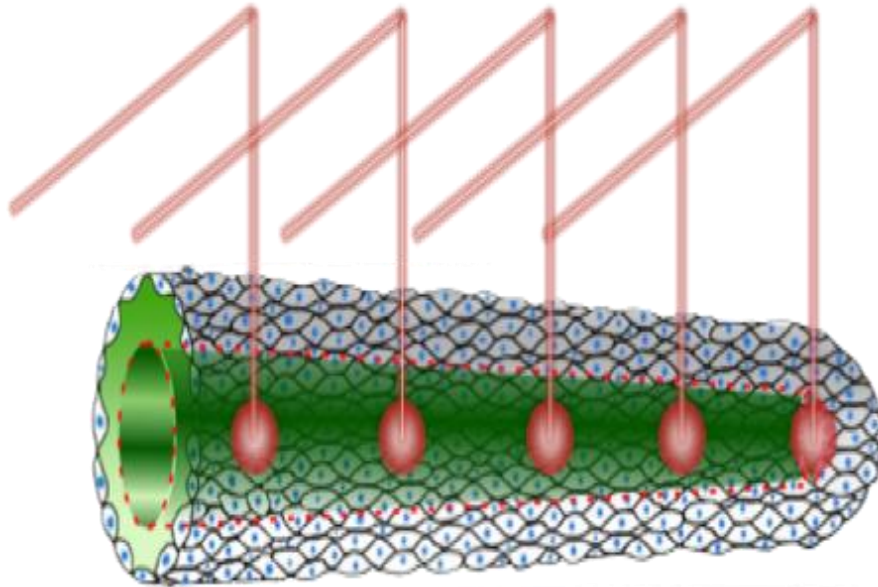


Figure 1 Schéma de principe de l'usinage d'une microfibre par laser fs. Le laser traverse la couche cellulaire externe de la fibre sans l'endommager pour détruire le collagène (en vert) à l'intérieur par interactions photoniques non linéaires.

Ce manuscrit est composé de 4 chapitres auxquels s'ajoutent des annexes détaillant les codes de programmation des platines laser ainsi que les macros de traitement d'images réalisées sous Image J. On peut également retrouver des définitions et des remarques en notes de bas de page tout au long du manuscrit pour en faciliter sa lecture. Le découpage des chapitres est détaillé ci-dessous :

Chapitre I : Ce chapitre présente le contexte général de la thèse en trois parties. La première partie montre le besoin de développer un modèle de microcapillaire glomérulaire perfusé, la seconde détaille les enjeux de l'ingénierie tissulaire et en particulier la nécessité de vasculariser les produits biofabriqués et finalement, la dernière partie présente un aperçu des études actuelles sur la réalisation d'usinage intravolumique de tissus biologiques mous avec un laser ultracourt. La problématique de thèse conclut ce chapitre.

Chapitre II : Ce chapitre détaille la mise au point des protocoles utilisés au cours de la thèse. On y trouve notamment la mise au point d'un modèle d'étude de l'interaction laser-hydrogel, la méthode de fabrication des microfibres et leurs caractérisations et enfin, la présentation de la station d'usinage laser.

Chapitre III : Ce chapitre s'articule sous la forme de deux articles étudiant la formation de canaux intravolumiques dans un hydrogel de gélatine par cavitation. Le premier est un proceeding de conférence qui s'intéresse à l'influence de trois paramètres laser sur l'usinage : la fluence, le nombre de passages et la profondeur de tir. Le second article étudie l'impact de l'accumulation thermique lors de la création des canaux en se focalisant notamment sur la dynamique des bulles de cavitation formées par les impulsions laser.

Chapitre IV : Ce dernier chapitre présente l'ensemble des résultats obtenus lors de la création d'une lumière à l'intérieur des microfibres par impulsions laser femtosecondes. La première partie est consacrée à l'impact des paramètres laser sur la qualité d'usinage et la viabilité cellulaire de la paroi externe tandis que la seconde partie s'intéresse à l'influence de paramètres extérieurs au laser tels que l'hydratation et le temps d'usinage.

CHAPITRE I.

Contexte et Etat de l'art

Ce premier chapitre introduit le contexte général de la thèse et les notions nécessaires à la compréhension de l'ensemble du manuscrit. Il est découpé en trois parties. La première partie expose la nécessité pour la recherche médicale et les patients souffrants d'insuffisance rénale chronique, de savoir produire un modèle de microcapillaire glomérulaire perfusé en trois dimensions. La seconde partie est consacrée à la présentation de l'ingénierie tissulaire et des stratégies qu'elle propose pour fabriquer un modèle de capillaire glomérulaire et ses limitations. En effet, l'ingénierie tissulaire est une discipline développant des procédés de fabrication de greffons et de modèles d'études en 3D pour la recherche médicale. L'une des stratégies proposées est la fabrication de microfibres d'hydrogels chargées en cellules. Cependant, le cœur de ces microfibres étant formé de collagène, elles sont non perfusables. L'originalité de cette thèse repose sur la création d'une lumière à l'intérieur de ces microfibres par un procédé d'usinage laser à impulsions femtosecondes. Dans ce but, la dernière partie est dédiée à l'interaction entre un laser à impulsions ultracourtes et un tissu mou et transparent pour générer des cavités intravolumiques sans endommager les cellules.

Des définitions, des concepts théoriques et une revue de la littérature sont présentés tout au long de ce chapitre pour faciliter la compréhension du sujet et de la problématique à laquelle tente de répondre cette thèse. Nous concluons en exposant les objectifs de la thèse.

I. Insuffisance rénale

I.1. Anatomie rénale et présentation du glomérule

Le rein est un organe complexe faisant partie du système urinaire de notre organisme. Il est composé d'environ un million d'unités fonctionnelles appelées néphrons, schématisés sur la Figure 2. Ces derniers assurent de nombreuses fonctions dont l'élimination des déchets, l'équilibre hydroélectrolytique du sang (homéostasie) ou encore la sécrétion hormonale.

Les néphrons sont composés de deux parties : le glomérule et le tubule. Le glomérule est le système de filtration rénale qui permet de produire l'urine primitive. Il est connecté au tubule, responsable de l'homéostasie de l'organisme par sécrétion et réabsorption des hydroélectrolytes aboutissant à l'urine définitive. Il est également impliqué dans la production hormonale.

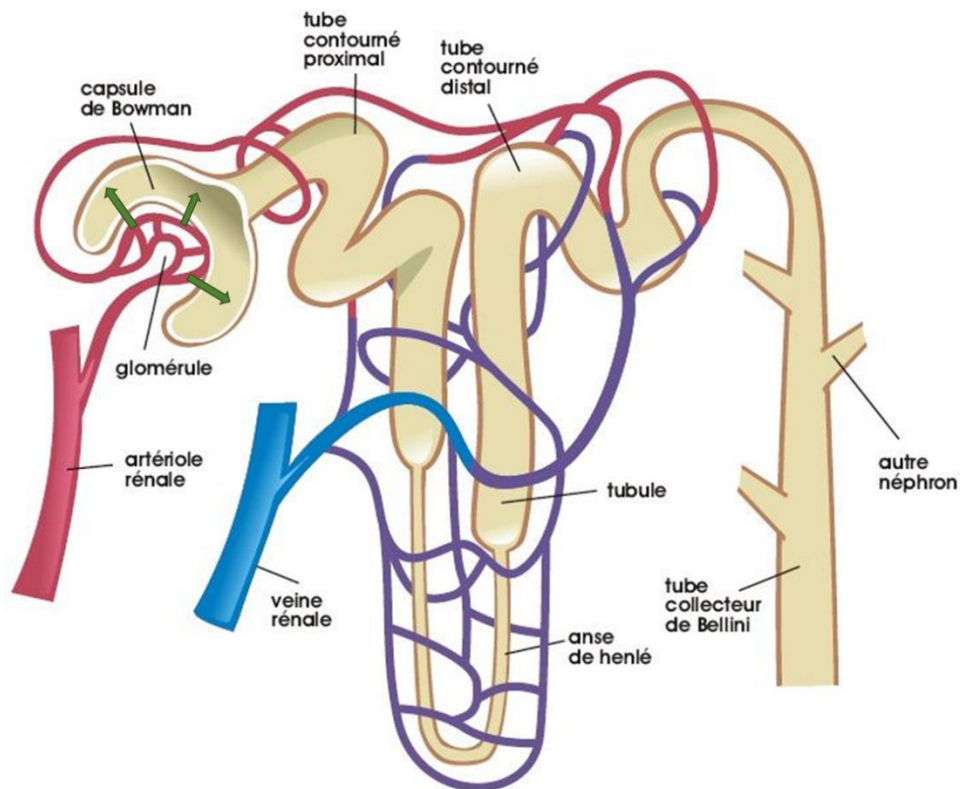


Figure 2 Schéma d'un néphron avec le glomérule impliqué dans la production d'urine primitive. Les flèches vertes montrent l'élimination des toxines par le glomérule rénal vers le tube contourné proximal.

Crédit : Denis Morin, support de cours

Le glomérule rénal est un enchevêtrement de microcapillaires entouré de la capsule de Bowman. Lorsque le sang passe dans ces microcapillaires, les toxines contenues dans le sang sont éliminées en traversant la barrière de filtration rénale *i.e.* la paroi des microcapillaires. Cette barrière est formée de trois entités : les cellules endothéliales constituant le tapis cellulaire interne du capillaire (CEG), la membrane basale glomérulaire (MBG), et les

podocytes situés sur le versant externe de la membrane. La MBG est formée par coopération des CEG et des podocytes au cours de l'embryogenèse. La Figure 3 schématise la barrière de filtration rénale et ses trois entités.

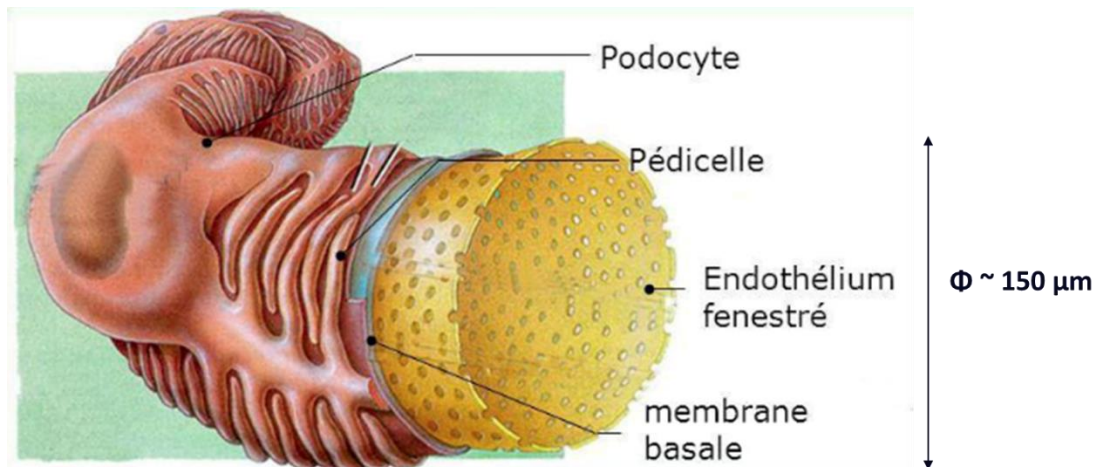


Figure 3 Schématisation de la membrane de filtration glomérulaire. Les podocytes et leur prolongement sont en rose, la membrane basale glomérulaire en bleu et l'endothélium fenestré en jaune.

Crédit : Dr. Rachid Azzouz, support de cours

I.1.1. Les cellules endothéliales glomérulaires (CEG)

Les cellules endothéliales glomérulaires sont situées sur le versant interne de la membrane basale et sont relativement similaires aux autres cellules endothéliales du corps humain. Elles apparaissent en jaune sur la Figure 3. Elles forment un tapis cellulaire qui constitue la paroi des vaisseaux sanguins et permet de contenir le sang. Ce tapis cellulaire est appelé endothélium. Cependant, les cellules endothéliales du glomérule ont la particularité de former un endothélium fenestré lui donnant un haut pouvoir de perméabilité hydrique [3]. Ces fenestrations, de 70 à 100 nm de large, permettent un contact direct entre le sang et la membrane basale. L'endothélium filtre ainsi les hydroélectrolytes et les petites molécules de poids moléculaire inférieures à 68 kDa [4].

I.1.2. La membrane basale glomérulaire

La membrane basale glomérulaire (MBG) est représentée en bleue sur la Figure 3. Elle est issue de la coopération des CEG avec les podocytes. Il s'agit d'une matrice extracellulaire¹ avec une perméabilité sélective des protéines contenues dans l'urine primitive en fonction de leur poids moléculaire (> 68 kDa) et de leur charge. En plus de son rôle de filtration, la MBG participe au maintien de l'organisation glomérulaire soumis à des forces de cisaillement

¹ La matrice extracellulaire correspond à l'ensemble des molécules extracellulaire sécrétées par les cellules. Elle fournit un support structural et biochimique aux cellules environnantes tout en jouant un rôle important dans l'adhésion cellulaire, la communication entre cellules et la différenciation.

induites par le flux sanguin intracapillaire [5]. Le collagène de type IV, triple-hélice $\alpha3-\alpha4-\alpha5$, y est majoritaire (voir paragraphe III.3.2.1.). On y trouve également des laminines, des nidogènes et des protéoglycanes lui donnant une charge négative responsable de la filtration sélective de la barrière.

I.1.3. Les podocytes

Les podocytes sont représentés en rose sur la Figure 3. Il s'agit de cellules épithéliales situées sur le versant externe – versant chambre urinaire - de la membrane basale. Ils possèdent des prolongements cytoplasmiques appelés pédicelles qui reposent sur toute la surface de la membrane basale. Les pédicelles sont interconnectés via un complexe multiprotéique dont le composant principal est la néphrine. Ce complexe multiprotéique, également appelé diaphragme de fente se situe dans un espace de 40 nm séparant les pédicelles, optiquement vide. Ce dernier est fondamental dans le rôle de filtration de la membrane basale glomérulaire.

L'ensemble de ces structures constitue la barrière de filtration glomérulaire. Elles lui confèrent une haute perméabilité à l'eau et aux petites molécules mais la rendent imperméable aux grosses molécules telles que les protéines de haut poids moléculaires comme l'albumine¹. Le liquide ainsi filtré est dénommé filtrat ou urine primitive. Il se retrouve au sein du glomérule dans la chambre urinaire délimitée par la capsule de Bowman, qu'il quitte par le pôle urinaire pour pénétrer dans le tubule, avant son excrétion sous forme d'urine définitive (voir Figure 2). Toute altération d'un composant de cette barrière de filtration entraîne une fuite urinaire de protéines, pouvant aboutir à une néphropathie².

I.2. Insuffisance rénale chronique

I.2.1. Définition

L'insuffisance rénale chronique (IRC) correspond à une diminution lente et irréversible des fonctions assurées par le rein. Le sang n'étant plus correctement filtré, les déchets issus du métabolisme tels que l'urée, la créatinine ou l'acide urique s'accumulent dans le sang. La maladie étant asymptomatique jusqu'à un stade avancé, il est difficile d'évaluer le nombre de patients mais il semblerait qu'environ 10 % de la population française soit atteinte d'une

¹ L'albumine est la protéine la plus abondante dans le sang. Elle permet notamment le transport du calcium, d'hormones ou de certains médicaments.

² La néphropathie est un dysfonctionnement de la filtration rénale. La maladie touche la membrane de filtration qui laisse passer des quantités importantes et anormales de protéines dans l'urine [127].

maladie rénale sans présenter de symptôme [6]. Avec une prévalence¹ et une incidence² croissante en France, l'IRC a ainsi été définie comme un enjeu majeur de santé publique. Elle est généralement la conséquence de maladies métaboliques telles que le diabète ou de maladies cardiovasculaires dont la prévalence augmente avec le vieillissement de la population et l'augmentation de modes de vie associant sédentarité et mauvaise alimentation. La maladie atteint le stade terminal lorsque les deux reins ont perdu 85 % de leur capacité de filtration. La fonction rénale doit alors être suppléée par une transplantation rénale ou par une méthode d'épuration comme la dialyse péritonéale ou l'hémodialyse [6].

I.2.2. Suppléance des fonctions rénales et leurs limitations

La dialyse débarrasse le sang des déchets et de l'eau accumulés dans le corps mais ne remplace que partiellement la fonction rénale. Bien qu'elle améliore la survie d'un patient, elle est aussi associée à de nombreuses contraintes. Le patient doit notamment se soumettre à des séances de dialyse plusieurs fois par semaine et un régime alimentaire strict pauvre en eau, en sel, en potassium et en phosphore [7]. En plus de représenter un coût économique important, elle est également associée à une morbi-mortalité importante avec 18 % de dialysés chroniques qui meurent chaque année [1].

La transplantation rénale quant à elle, permet d'améliorer la qualité et l'espérance de vie d'un patient. Après 10 ans, 70 % des greffons sont encore fonctionnels et 50 % après 14 ans. Elle nécessite toutefois la prise de traitements immunosuppresseurs responsables de complications infectieuses ou cancéreuses. Mais sa plus grande limitation reste la pénurie de greffons. En 2015, 3 488 greffes ont été effectuées pour un nombre total de demandes de 16 529 [6].

I.2.3. Les enjeux de la recherche

L'enjeu pour la recherche est de mieux connaître les mécanismes des maladies rénales pour limiter leur évolution vers le stade terminal en facilitant leur diagnostic et en adaptant les stratégies thérapeutiques. Ces 10 dernières années, de nombreux progrès ont permis une meilleure prise en charge de certaines formes d'IRC et une réduction des récurrences notamment avec l'utilisation de nouvelles molécules plus performantes. Cependant, la physiopathologie³

¹ La prévalence désigne le nombre de cas total d'une maladie durant une période de temps donnée et pour une population donnée

² L'incidence désigne le nombre de cas nouveaux d'une maladie durant une période de temps donnée et pour une population donnée

³ La physiopathologie est l'étude des troubles du fonctionnement de l'organisme, ou de ses parties, au cours des maladies [128].

des maladies relatives au glomérule n'est que partiellement comprise. La raison principale est l'absence d'un modèle expérimental fiable et reproductible. Plusieurs approches ont été développées afin de reproduire le glomérule et ses fonctions *in vitro* mais ces approches sont confrontées à la difficulté de reproduire l'architecture tridimensionnelle complexe d'un glomérule constitué de plusieurs types cellulaires différents interagissant entre eux.

I.3. Modèles expérimentaux en néphrologie

I.3.1. Les modèles murins *in vivo*

L'utilisation d'un modèle animal et en particulier le modèle murin - rat ou souris - est couramment utilisé pour étudier la physiologie rénale [8] et les mécanismes de ses maladies [9]. Ils sont également utilisés lors des études pré-cliniques pour étudier l'efficacité et l'innocuité des thérapies. Ces modèles ont permis une grande avancée en néphrologie mais manquent de pertinence concernant les pathologies humaines en raison de problèmes de transposition entre différentes espèces [10]. Par exemple, la fibrose rénale n'est pas reproductible chez l'animal et l'évolution spontanée de certaines pathologies ainsi que leurs réponses thérapeutiques diffèrent des pathologies humaines [11]. C'est pourquoi des modèles *in vitro* ont été développés.

I.3.2. Les modèles cellulaires *in vitro*

Une alternative au modèle animal est le modèle cellulaire. L'utilisation de cellules humaines a permis de s'affranchir des problèmes de transposition entre espèces et a amélioré la compréhension de certains mécanismes physiologiques. Les modèles de cocultures ont montré l'importance de la communication entre les cellules épithéliales et les cellules endothéliales sur l'expression protéique et sur les fonctions cellulaires [12, 13]. Il est cependant difficile d'extrapoler des résultats issus de la culture d'un seul ou de plusieurs types cellulaires sur des boîtes de Petri en deux dimensions. En effet, le glomérule rénal possède une architecture tridimensionnelle complexe faisant intervenir de nombreux types cellulaires interagissant par de multiples voies. Particulièrement, la membrane basale glomérulaire est un espace d'échanges entre les différents types cellulaires qui lui font face. Son organisation spatiale incite à développer un modèle expérimental tridimensionnel pour l'étude de la physiopathologie glomérulaire et de la barrière de filtration.

Enfin, sous l'action du flux sanguin, les cellules glomérulaires sont soumises à des contraintes de cisaillement et d'étirement. Des études ont montré que ces contraintes influent sur la morphologie des podocytes [14, 15], leur expression protéique [16, 17] ou encore sur l'organisation de leur cytosquelette [14, 18]. Partant de ce constat, Jang *et al.* ont montré

l'importance de privilégier des modèles dynamiques plutôt que des modèles statiques notamment lors d'études portant sur la néphrotoxicité d'agents biochimiques [15].

Afin de modéliser la richesse des interactions au sein du glomérule, il est primordial de développer un modèle en trois dimensions microvascularisé. Ce modèle pourrait être obtenu en combinant les principes de la biologie cellulaire et des techniques d'ingénierie, grâce à l'ingénierie tissulaire.

II. Ingénierie tissulaire

II.1. Introduction à l'ingénierie tissulaire

II.1.1. Définition

Comme l'écrivaient Langer et Vacanti en 1993, l'ingénierie tissulaire est un domaine interdisciplinaire appliquant les principes de l'ingénierie et des sciences de la vie pour développer des substituts biologiques permettant de restaurer, maintenir et améliorer les fonctions des tissus cellulaires [19]. Ces substituts sont élaborés à partir de composant de l'organisme vivant comme par exemple des cellules ou des constituants de la matrice extracellulaire (ECM) telles que des protéines structurales ou des facteurs de croissance.

L'un des objectifs principaux de l'ingénierie tissulaire souvent mis en avant par les chercheurs est le développement d'organes de substitution sur mesure ciblant spécifiquement les besoins de chaque patient. Le développement et l'utilisation de greffons personnalisés permettrait de pallier la pénurie de greffons humains [2] tout en limitant les risques infectieux et les rejets de greffes par l'utilisation de cellules autologues¹. Ces greffons issus de l'ingénierie tissulaire présenteraient de vrais avantages par rapport aux greffons réalisés dans des matériaux synthétiques. En effet, ces derniers sont limités par leur manque de propriétés biologiques, notamment en termes de biocompatibilité et de régénération tissulaire [20].

Mais malgré d'importantes avancées ces dernières années en ingénierie tissulaire, seuls les organes peu complexes et faiblement vascularisés comme la peau [21] ou la vessie [22] sont aujourd'hui biofabriqués et implantés [23]. L'apport de l'ingénierie tissulaire à la médecine n'en reste pas moins important. Les méthodes développées à l'heure actuelle permettent la mise au point de modèles d'études *in vitro* pour l'étude de différentes pathologies, tout en apportant de nouveaux outils pour le développement futur de tissus de substitution voire d'organes.

¹ Les cellules autologues sont des cellules provenant de son organisme et administrées à soi.

II.1.2. Principaux enjeux de l'ingénierie tissulaire

La création d'un organe entier ou d'un tissu complexe viable pour l'organisme représente aujourd'hui un réel enjeu pour l'ingénierie tissulaire. Mais pour y parvenir, de nombreux challenges restent encore à surmonter :

- Premièrement, la création d'un organe entier est limitée par la complexité de son organisation. Les organes et, en particulier, le rein sont constitués de multiples types cellulaires différents, assemblés dans une organisation tridimensionnelle complexe à différentes échelles avec de multiples échanges intercellulaires, qui devront être compris puis reproduits.
- La deuxième difficulté concerne les risques de rejet des greffons par l'organisme receveur et la perte de viabilité du tissu biofabriqué. Pour ce faire, les méthodes et matériaux utilisés doivent être biocompatibles, avec une faible immunogénicité¹ et respectueux de l'intégrité cellulaire. Les technologies faiblement invasives comme l'utilisation du laser et de matériaux présents naturellement dans le corps humain sont à privilégier pour réduire ces risques.
- Enfin, la plus grande difficulté en ingénierie tissulaire reste la vascularisation des tissus. L'immense réseau de vaisseaux sanguins de l'organisme assure l'irrigation de l'ensemble des cellules du corps et maintient la survie cellulaire en leur apportant oxygène et nutriments. Sans oxygène et nutriments, les cellules nécrosent. En raison de la difficulté actuelle de créer un réseau vasculaire viable, les tissus obtenus aujourd'hui par ingénierie tissulaire restent très rudimentaires.

II.2. La vascularisation

II.2.1. Problème de vascularisation des tissus issus de l'ingénierie tissulaire

La vascularisation est l'ensemble des vaisseaux sanguins irriguant une région du corps, un organe ou un tissu [24]. Ils permettent d'apporter l'oxygène et les nutriments nécessaires au fonctionnement et à la survie cellulaire tout en assurant l'élimination du dioxyde de carbone et des déchets qu'elles produisent. Sans vascularisation, les cellules ne peuvent survivre et nécrosent. Pour que ce système d'irrigation soit efficace et assure l'approvisionnement de chacune des cellules de l'organisme, le réseau vasculaire est composé de vaisseaux de gros calibres (artères et veines) divisés en vaisseaux de petits calibres (artérioles et veinules), eux-mêmes divisés en capillaires puis en microcapillaires sanguins. Cette architecture en arbre permet d'alimenter chacune des cellules de l'organisme. La diffusion de l'oxygène dans les

¹ L'immunogénicité est la capacité qu'à un matériau de déclencher une réponse immunitaire bien spécifique.

tissus est limitée à une distance d'environ 100 μm [25, 26]. Ainsi, pour qu'une cellule reçoive l'oxygène nécessaire à sa survie, elle doit être située à moins de 100 μm d'un microcapillaire. Pour éviter l'ischémie¹ puis la mort tissulaire, les microcapillaires se trouvent donc séparés les uns des autres par une distance maximale de 200 μm (Figure 4).

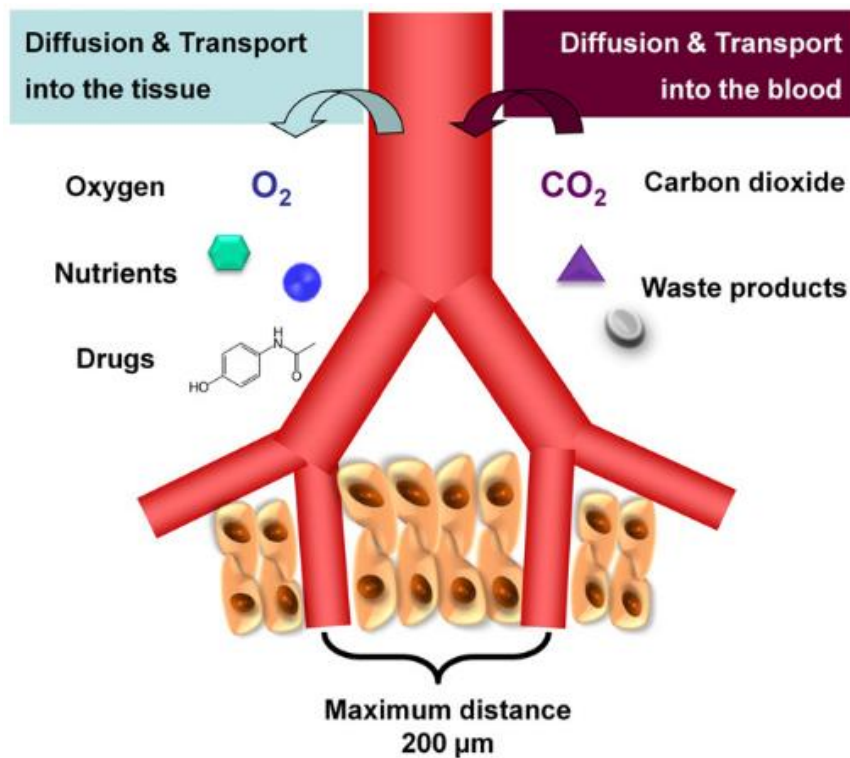


Figure 4 Description schématique de la limite de diffusion dans les systèmes vasculaires *in vivo*. Les tissus environnants sont approvisionnés en oxygène, nutriments et médicaments via un réseau dense de capillaires. Le CO_2 et les déchets cellulaires sont également éliminés par le réseau vasculaire [25].

En conséquence, seuls les tissus comme l'épiderme de la peau ou la vessie ont été biofabriqués et implantés avec succès [21–23]. Pour ces tissus, la faible épaisseur autorise les échanges de nutriments et d'oxygène.

En revanche, la biofabrication de tissus de plus gros volume est pour l'instant réservée aux études *in vitro* où ces tissus sont approvisionnés en oxygène et nutriments par des bioréacteurs à perfusion améliorant la diffusion des nutriments dans les tissus [27, 28]. Pour assurer la vascularisation *in vivo* de ces tissus biofabriqués après implantation, un système de vascularisation homogène, comprenant un réseau de capillaires assurant l'approvisionnement de chacune des cellules, est requis.

¹ L'ischémie est l'arrêt ou l'insuffisance de la circulation sanguine dans une partie du corps ou d'un organe, privant les cellules de l'apport en oxygène et entraînant leur nécrose.

II.2.2. Stratégies de vascularisation des tissus bioconstruits

Plusieurs stratégies ont été élaborées pour favoriser la vascularisation des tissus bioconstruits après implantation. Les premières approches se sont inspirées des mécanismes *in vivo* de vascularisation, l'angiogenèse et la vasculogenèse. Lors de la vasculogenèse, des cellules endothéliales progénitrices¹ migrent vers les sites ischémiques, prolifèrent puis se différencient pour former des capillaires sanguins, tandis que durant l'angiogenèse, de nouveaux vaisseaux sanguins bourgeonnent et poussent à partir de vaisseaux sanguins préexistants à l'aide d'un gradient de facteurs angiogéniques² [29, 30]. Qu'ils soient formés par angiogenèse ou vasculogenèse, les vaisseaux sont ensuite remodelés par l'environnement cellulaire et mûrissent pour s'adapter aux besoins spécifiques des tissus. De nombreuses approches se sont inspirées de ces deux mécanismes pour initier le développement d'un réseau vasculaire tridimensionnel pouvant s'intégrer au réseau vasculaire de l'organisme receveur lors d'une greffe. Parmi les nombreuses techniques développées pour assurer la vascularisation des greffons *in vivo*, on observe deux tendances. Une partie des études s'est concentrée sur les effets synergiques des cellules, des biopolymères et des facteurs angiogéniques, pour initier et accélérer la vascularisation des tissus *in vitro* dans l'optique d'une greffe. Le pré-réseau vasculaire s'intègre ensuite au réseau vasculaire de l'hôte. Enfin, d'autres études se sont penchées sur le développement de techniques de fabrication de vaisseaux sanguins et de réseau vasculaire en 3D. Je m'intéresserai ici uniquement à ces dernières études, car elles permettent aussi bien l'élaboration de vaisseaux sanguins implantables *in vivo* que la création d'un modèle d'étude de physiopathologie d'un vaisseau sanguin *in vitro*.

¹ Une cellule progénitrice est une cellule souche un peu plus différenciée. Elle ne présente pas encore de signe de différenciation mais, après trois ou quatre divisions, donne naissance à une ou plusieurs lignées cellulaires différenciées. Les cellules progénitrices sont issues de cellules souches multipotentes (non différenciées).

² Les facteurs angiogéniques permettent de réguler – d'activer ou d'inhiber – le mécanisme d'angiogenèse permettant la croissance de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux préexistants.

II.2.3. Fabrication 3D de vaisseaux et de réseaux vasculaires

Différentes techniques inspirées de l'ingénierie ont été développées et adaptées dans le but de fabriquer des réseaux vasculaires et des vaisseaux sanguins. On retrouve notamment :

- la bioimpression : par jet d'encre, extrusion ou impression laser
- la création de canaux à l'intérieur de structures de soutien¹ suivi d'un ensemencement de cellules endothéliales : gravure au plasma, usinage laser, moulage...
- la mise en forme de feuillet cellulaire : tissage ou enroulement de feuillet cellulaire
- la fabrication de microfibres d'hydrogels chargées en cellules

II.2.3.1. Les techniques de bioimpression

La formation d'un réseau de capillaires sanguins perfusables à l'intérieur d'un tissu biofabriqué macroscopique est possible notamment à l'aide de la bioimpression 3D. Ces techniques de fabrication additive permettent de déposer une bioencre couche par couche selon un motif prédéfini par ordinateur. La bioencre est constituée de composants biologiques comme des cellules, des protéines ou encore des éléments nutritifs. Différentes méthodes de bioimpression existent : par jet d'encre, par extrusion ou par laser.

Impression par jet d'encre et par extrusion :

L'impression par jet d'encre permet le dépôt de microgouttelettes de bioencre couche par couche sur un substrat récepteur via une buse d'impression tandis que l'impression par extrusion permet le dépôt d'un long filament continu de bioencre. Ces techniques d'impression assurent le dépôt des cellules sur le substrat avec une très grande densité cellulaire qui favorise la génération vasculaire. Après le dépôt cellulaire, des réseaux vasculaires se forment et mûrissent en culture *in vivo* ou *in vitro* [31–33]. L'impression par jet d'encre ou par extrusion est rapide, simple d'utilisation et économique mais la buse d'impression se retrouve souvent obstruée et l'éjection des cellules à travers la buse d'impression crée de nombreux dommages cellulaires en raison des forces de cisaillement.

Il est également possible de fabriquer des vaisseaux avec une lumière interne avec un procédé d'extrusion indirecte. Dans ce cas, une solution contenant des cellules et un hydrogel est utilisée pour encapsuler un réseau vasculaire sacrificiel préfabriqué. Après gélification de l'hydrogel, le réseau sacrificiel est dissous avec un solvant adéquat. Des cellules endothéliales sont ensuite injectées dans les canaux formés. La perfusion des canaux avec du milieu de culture ou du sang permet d'aider les cellules endothéliales à former un tapis cellulaire

¹ Une structure de soutien (ou scaffold en anglais) est un biomatériau servant en ingénierie tissulaire de support tridimensionnel permettant le maintien et la croissance cellulaire en imitant la matrice extracellulaire.

confluent en moins de deux jours tout en alimentant les cellules en oxygène et nutriments [34]. Le schéma d'un exemple de réseau vasculaire sacrificiel imprimé est présenté sur la Figure 5 où les différentes étapes de fabrication du réseau vasculaires sont montrées. Dans un premier temps, un réseau sacrificiel est imprimé puis encapsulé à l'intérieur d'un hydrogel chargé en cellules. Le réseau est dissous par ajout de milieu puis perfusé [35].

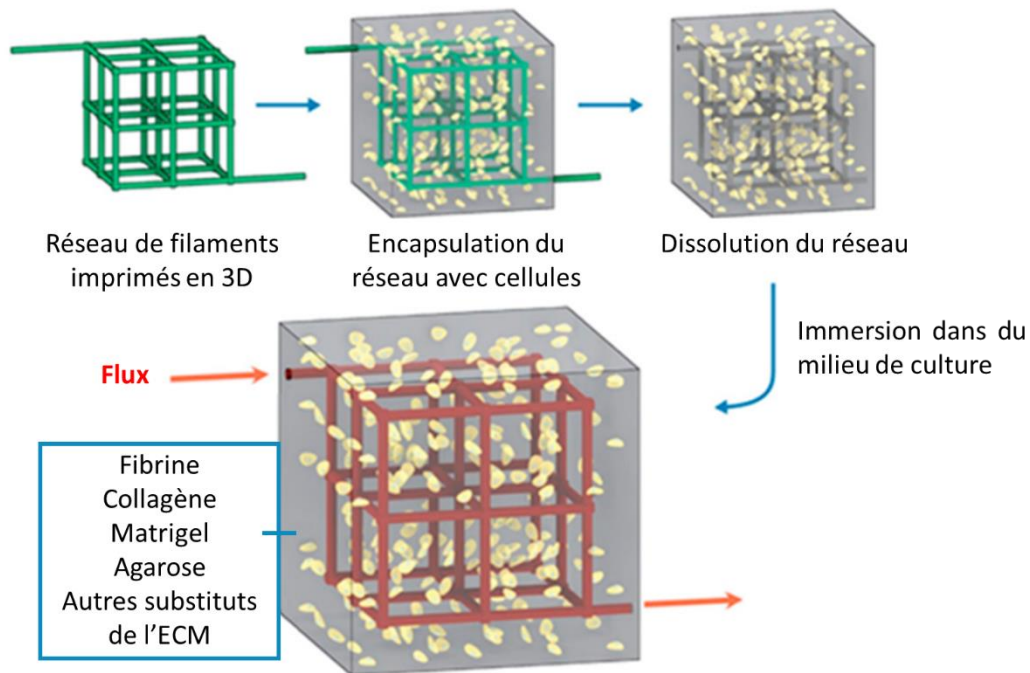


Figure 5 Un réseau vasculaire sacrificiel bioimprimé est encapsulé d'une solution d'hydrogel et de cellules puis dissous pour permettre la création d'une architecture vasculaire perfusable [35].

Bioimpression laser :

L'essor des technologies lasers de ces dernières années a permis de développer des techniques de bioimpression 3D assistées par laser également appelé Laser Induced Forward Transfer ou LIFT. La microgouttelette de bioencre déposée sur le support récepteur est ici formée et projetée lorsqu'une impulsion laser arrive sur un film de bioencre. Le schéma de principe se trouve en Figure 6. L'avantage premier des imprimantes lasers est leur capacité d'impression avec une bonne précision et une très grande résolution spatiale. De plus, contrairement aux imprimantes par jet d'encre ou par extrusion, les imprimantes lasers ne nécessitent pas de tête d'impression risquant de s'obstruer et peuvent donc être utilisées pour imprimer des encres de plus forte viscosité. Bien que très prometteuse, la bioimpression laser est une technologie extrêmement coûteuse et chronophage. Elle cause en outre de nombreux

dégâts cellulaires lorsque les cellules sont projetées du film d'encre vers le substrat suite à l'impulsion laser [36–39].

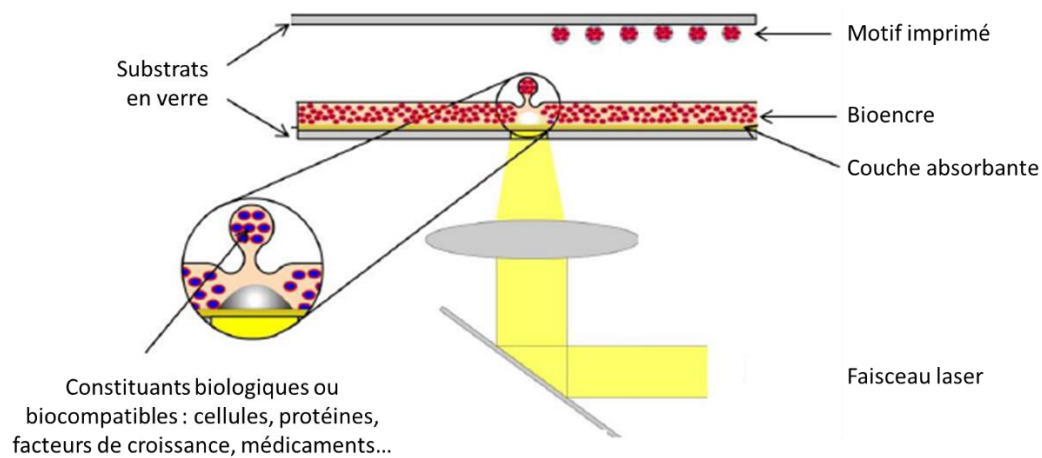


Figure 6 Schéma de principe du LIFT [36].

Il existe d'autres techniques utilisant le laser plus rapides et moins coûteuses que la bioimpression. On peut notamment citer les méthodes de stéréolithographies qui génèrent des motifs vasculaires complexes en trois dimensions en projetant les motifs sur des matériaux photosensibles. Les motifs créés sont ensuiteensemencés évitant les dommages cellulaires dus à l'interaction laser [40].

II.2.3.2. Création de canaux intravolumiques à l'intérieur de matériaux biocompatibles

De nombreux modèles de réseaux vasculaires perfusables ont été développés pour imiter la structure native d'un lit de microcapillaires. Ces techniques visent à créer des microcanaux ou des motifs représentant un lit de capillaires en surface (2D) ou à l'intérieur de matériaux (3D) biocompatibles. La fabrication de ces canaux en 2D ou 3D est suivie dans un second temps de l'ensemencement de cellules endothéliales puis de la perfusion des canaux afin d'obtenir la formation d'une monocouche de cellules endothéliales tapissant la paroi interne des microcanaux.

La génération 2D des microcanaux en surface des biomatériaux peut être réalisée en retirant une ou plusieurs couches de matière soit par gravure au plasma (bombardement du matériau par un gaz ionisé [41]) soit par ablation laser (focalisation du faisceau laser à la surface du matériau [42]) soit par moulage (le biomatériau est moulé sur un gabarit de microcanaux en PDMS¹ [43]).

¹ Le PDMS ou polydiméthylsiloxane est un polymère organo-minéral (structure contenant du carbone et du silicium). Il est couramment utilisé pour la fabrication et le prototypage de puces microfluidiques en étant mélangé à un agent réticulant. Après réticulation, le PDMS devient hydrophobe.

Pour obtenir des structures en 3D, l'empilement des structures 2D est possible mais la réalisation de chacune des couches puis leur empilement restent très complexes et chronophages. Les scientifiques ont alors développé d'autres méthodes comme la génération de canaux dans les matériaux transparents par laser ultracourts (paragraphe III.3), la polymérisation à 2 photons par laser [44] ou encore l'impression d'hydrogel par extrusion sur des matériaux sacrificiels [35] (paragraphe techniques de bioimpression).

La seconde étape consiste à ensemencer des cellules endothéliales à l'intérieur des canaux 2D ou 3D puis de les perfuser afin d'obtenir un tapis cellulaire confluent. Plusieurs études ont montré que l'écoulement microfluidique à travers un canal ensemencé de cellules régule la distribution spatiale et temporelle des cellules à l'intérieur des canaux [45]. Les forces de cisaillement créées par l'écoulement contrôlent la morphologie, l'alignement et la différenciation des cellules endothéliales et favorisent la fonctionnalisation des microcapillaires [46].

Pour faciliter la génération de ces structures microfluidiques, les matériaux utilisés restent majoritairement des matériaux synthétiques car ils sont plus résistants que les matériaux naturels [47]. Mais ces substrats synthétiques sont faiblement biocompatibles et limitent la pousse des cellules endothéliales. Ils induisent également des réponses inflammatoires *in vivo* [48].

II.2.3.3. Mise en forme de feuillet cellulaire

L'utilisation de support de soutien a permis d'obtenir des progrès conséquents dans la génération de tissus vasculaires. Cependant, la durabilité de ces constructions biologiques *in vivo* est controversée en raison de l'ajout de matériaux étrangers à l'organisme. En effet, l'incorporation de matériaux extérieurs lors de la fabrication de tissus pourrait entraver les interactions intercellulaires et causer de l'inflammation ou un remodelage tissulaire. De plus, l'étude des mécanismes de développement tissulaire au stade embryonnaire suggère que les cellules sont capables de créer leur propre matrice extracellulaire.

Des approches pour former des tissus vasculaires sans scaffold ont alors été mises au point. Parmi ces approches, on peut notamment citer l'utilisation de feuillet cellulaire. Ainsi, Okano *et al.* ont mis en culture des cellules endothéliales et des hépatocytes pour former des feuillets cellulaires. La culture était réalisée sur des matériaux thermoactifs afin de faciliter le détachement du feuillet du support de culture. En passant de 37 °C à 25 °C, le matériau support passait d'hydrophobe à hydrophile. Par changement de température, plusieurs feuillets sont ainsi détachés de leur support de culture puis empilés les uns sur les autres pour former des tissus plus épais constitués de différents types cellulaires. Ces feuillets sont ensuite

enroulés sur eux-mêmes pour former un tube. Après 3 jours de perfusion, les cellules endothéliales des feuillets cellulaires enroulés ont formé des capillaires avec une lumière centrale. Les résultats de la perfusion de ces feuillets sont remarquables mais leur faible stabilité mécanique est un inconvénient majeur [49].

Pour renforcer la stabilité mécanique, L'Heureux *et al.* ont découpé des rubans dans des feuillets cellulaires similaires qu'ils ont ensuite torsadés pour former des fils. Les vaisseaux sanguins sont ensuite fabriqués en tissant les fils obtenus entre eux. Cependant, le tissage manuel restreint cette technique de fabrication à des vaisseaux sanguins de gros diamètre (~5mm de diamètre) [50].

II.2.3.4. Fabrication de microfibres d'hydrogel chargé en cellules

Enfin, il existe également des techniques consistant à mettre en forme des hydrogels chargés de cellules pour obtenir des fibres micrométriques proches de l'architecture de microcapillaires. Pour ce faire, Onoe *et al.* utilisent un appareil microfluidique coaxial pour fabriquer une microfibre composée de collagène et de cellules endothéliales. La microfibre obtenue mesure plus d'un mètre de long avec un diamètre externe de 200 µm environ. La fabrication de cette fibre se fait en 3 étapes [51]:

1. La première étape consiste à utiliser un triple flux coaxial comme illustré sur la Figure 7. Au centre, une solution contenant des cellules et un hydrogel de collagène est injectée. Ce flux central est entouré par un flux secondaire d'une solution d'alginate de sodium, lui-même entouré d'un flux externe d'une solution de chlorure de calcium. Cette première étape aboutit à la formation d'une gaine d'alginate réticulée par le chlorure de calcium à l'intérieur de laquelle se trouvent des cellules et un hydrogel de collagène.
2. Durant la seconde étape, les microfibres sont mises à l'incubateur à 37 °C pour laisser le collagène gélifier dans la gaine d'alginate. Après gélification complète, le collagène peut servir de support de culture cellulaire et permettre aux cellules endothéliales de migrer et de se structurer pour former un tube cellulaire tapissant la paroi interne de la gaine d'alginate.
3. Enfin, la gaine d'alginate est libérée par l'action enzymatique d'un bain d'alginate lyase.

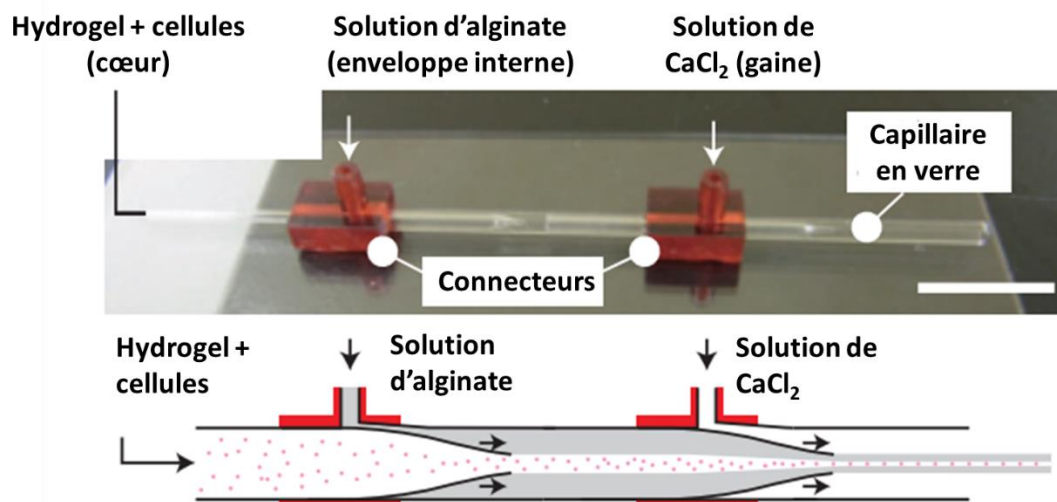


Figure 7 Photo et schéma du système de triple flux coaxial permettant de fabriquer des fibres d'hydrogel chargées en cellules et entourées d'une gaine d'alginate réticulée. Barre d'échelle : 1mm [51].

La microfibre finale obtenue est constituée d'une couche externe de cellules endothéliales recouvrant un cœur d'hydrogel de collagène.

II.3. Ingénierie tissulaire appliquée au rein

Certaines méthodes présentées précédemment peuvent être adaptées au cas plus spécifique d'un modèle d'étude de la barrière de filtration glomérulaire et de la physiopathologie rénale. Bien que les méthodes de bioingénierie tissulaire soient multiples, beaucoup ne s'adaptent pas au cas spécifique du rein. Ainsi, la plupart des travaux réalisés sur le rein ne concerne que l'épithélium tubulaire. L'obtention d'une structure glomérulaire reste aujourd'hui difficile du fait de la complexité de son architecture tridimensionnelle, de la spécificité des différents types cellulaires qui la composent et de la difficulté à reproduire la MBG *in vitro*. Quelques techniques ont cependant vu le jour pour reproduire la structure de la barrière glomérulaire *in vitro*.

II.3.1. Les organoïdes

Un organoïde est une structure tridimensionnelle composée de multiples types cellulaires et reproduisant *in vitro* la microarchitecture et les fonctionnalités d'un organe. S'inspirant des mécanismes embryonnaires, les scientifiques ont développé ces dix dernières années des techniques de fabrication d'organoïdes représentatifs de plusieurs tissus différents. Ces techniques commencent à se généraliser de plus en plus et semblent devenir progressivement incontournables pour l'étude des mécanismes de la physiologie et de la physiopathologie [52].

Concernant les applications rénales et l'obtention d'un glomérule, la fabrication d'organoïdes est notamment très prometteuse en raison de la complexité du rein.

La fabrication d'organoïdes est réalisée à partir de cellules souches ou de cellules progénitrices un peu plus différenciées dans un environnement tridimensionnel favorable au développement de l'organoïde. Les cellules s'auto-organisent en suivant les différentes étapes du développement embryonnaire *in utero*. Les cellules mûrissent peu à peu à l'aide de facteurs de croissance et de facteurs de différenciation délivrés séquentiellement *in vitro*.

Différentes équipes ont réussi à reproduire des organoïdes rénaux complexes composés de multiples types cellulaires interagissant entre eux et avec le réseau vasculaire. L'équipe de Takasato *et al.* a obtenu des organoïdes multicellulaires similaires à un rein fœtal humain en modulant la signalisation des cellules souches pluripotentes et en délivrant séquentiellement différentes molécules [53]. Xinaris *et al.* ont fabriqué des organoïdes rénaux *in vitro* à partir de suspensions cellulaires. Après implantation *in vivo*, ces organoïdes étaient capables de mûrir et de former un glomérule rénal vascularisé, doté de capacité de filtration partielle et de réabsorption de molécules [54].

Des organoïdes de glomérule rénal ont été fabriqués plus récemment par Hale *et al.* Les cellules exprimaient ici les marqueurs de différenciation spécifique des podocytes et témoignaient de la formation d'une membrane basale glomérulaire [55].

Malgré des progrès très encourageants, les techniques de production de ces organoïdes ne sont pas encore normalisées et aboutissent aujourd'hui à des cellules de différents niveaux de maturité [56].

II.3.2. Techniques de bioimpression

L'utilisation de la bioimpression 3D est aujourd'hui omniprésente en ingénierie tissulaire et a été par conséquent utilisée pour tenter de fabriquer des reins. Les bioimprimantes permettent le dépôt précis de cellules et de matériaux biologiques sur un papier biologique composé le plus souvent d'un hydrogel biocompatible. En ingénierie tissulaire rénale, des structures tubulaires perfusables ont été imprimées et ont permis l'étude de la néphrotoxicité sur l'épithélium tubulaire rénal [57, 58]. Des uretères fonctionnels ont également été imprimés par l'équipe de Zhang *et al.* [59]. En revanche, les bioimprimantes n'ont pas réussi à imprimer ni de néphron ni de modèle glomérulaire en raison de leur grande complexité tridimensionnelle à l'échelle micrométrique. En plus des difficultés pour reproduire l'architecture complexe des organes, les méthodes de bioimpression 3D causent aujourd'hui des dommages cellulaires

conséquents qui sont incompatibles avec la fabrication de modèle d'étude ou de greffons viables.

II.3.3. Kidney on-a-chip

Le principe d'un rein sur puce ou kidney on-a-chip est de modéliser certaines fonctions rénales sur une puce 2D à l'aide d'un écoulement microfluidique. Des cellules sontensemencées et cultivées à l'intérieur de canaux préfabriqués puis les canaux sont soumis à un flux (milieu de culture ou plasma). Ces puces avec canaux intégrés sont élaborées selon les techniques présentées au paragraphe II.2.3.2. et réalisées le plus souvent dans des matériaux synthétiques. L'action de ce flux permet aux cellules de se différencier et d'acquérir la morphologie et la fonctionnalité d'une cellule de l'organisme. En effet, un écoulement dynamique génère des forces de cisaillement et d'étirement qui influencent la morphologie des podocytes [14, 15], leur expression protéique [16, 17] ou l'organisation de leur cytosquelette [14, 18]. Ces reins sur puce ont par exemple permis d'étudier la néphrotoxicité sur l'épithélium tubulaire [15]. Plus récemment, Musah *et al.* ont mis au point le premier glomérule sur puce en ensemençant des cellules endothéliales et des podocytes de part et d'autre d'une membrane poreuse [60]. En contrôlant le débit de l'écoulement pour imiter les pulsations du sang à l'intérieur des glomérules, Zhou a étudié la physiopathologie de la néphropathie hypertensive, le schéma de principe de son glomérule sur puce est représenté sur la Figure 8 [61].

Toutefois, ces reins sur puce sont limités à deux dimensions et peinent à reproduire *in vitro* la complexité de l'architecture tridimensionnelle du glomérule et de la membrane basale glomérulaire ainsi que la spécificité des différents types cellulaires qui la composent.

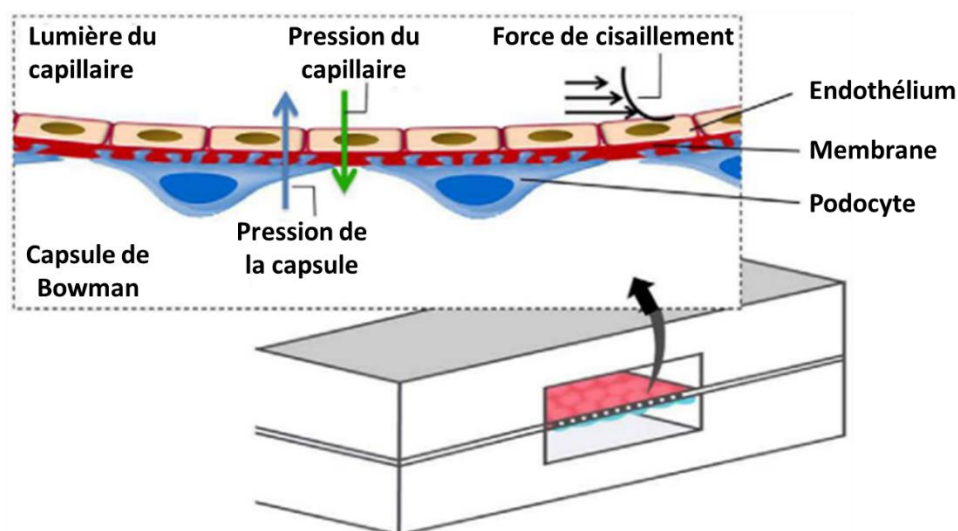


Figure 8 Schéma d'un glomérule sur puce [61].

II.3.4. Utilisation d'une structure de soutien (scaffold)

Des structures servant de support aux cellules appelées scaffolds sont couramment utilisées en ingénierie tissulaire. Elles permettent le maintien et le développement de vaisseaux sanguins dans une structure 3D proche de l'organe à reproduire. Deux grands types de structure peuvent être utilisés : ceux issus de matériaux biologiques et ceux issus de matériaux synthétiques.

Structures de soutien d'origine biologique :

Les scaffolds d'origine biologique sont le plus souvent des organes ou des tissus prélevés sur des mammifères puis décellularisés. Après décellularisation, on vient réimplanter de nouvelles cellules. Différents procédés de décellularisation de ces tissus cadavériques ont été mis au point : traitements chimiques, enzymatiques ou physiques. Ces procédés permettent de retirer les cellules tout en préservant l'architecture 3D du tissu et la matrice extracellulaire qui contient principalement du collagène et des facteurs de croissance et d'adhésion. Ces squelettes biologiques servent de matrices biocompatibles et favorisent le développement d'un réseau microvascularisé [62]. Ils sont particulièrement intéressants pour les applications rénales car ils permettent d'obtenir très facilement la matrice rénale. Des études ont montré que l'ensemencement de cellules glomérulaires (épithéliales et vasculaires) à l'intérieur de scaffolds de tissus rénaux préalablement décellularisés favorisait la survie et la prolifération cellulaire [63, 64]. Plus récemment, Fedecostante a obtenu une structure tubulaire rénale en ensemençant des cellules tubulaires proximales sur un scaffold décellularisé. Cette structure lui a permis d'étudier la néphrotoxicité de différents agents comme la cisplatine, le tenofovir ou la ciclosporine [65].

L'utilisation de scaffolds décellularisés prélevés sur des cadavres d'animaux est cependant limitée car ces scaffolds ne sont ni standardisés ni reproductibles. Il existe également des problèmes d'immunogénicité et de corrélation entre espèces.

Scaffolds synthétiques :

Les scaffolds de matériaux synthétiques sont quant à eux d'avantage reproductibles et peuvent être utilisés en combinaison d'autres techniques d'ingénierie tissulaire comme la bioimpression 3D ou les méthodes microfluidiques développées dans les paragraphes précédents. La contrainte principale des matériaux synthétiques est liée aux propriétés intrinsèques de ces matériaux. Il s'agit de trouver un compromis entre les différentes propriétés que sont la rigidité, la résistance mécanique, la topographie de surface, la biocompatibilité ou la biodégradabilité. Le choix du matériau est un critère d'importance mais l'utilisation d'un

matériau étranger à l'organisme est connue pour augmenter les risques de réponses inflammatoires *in vivo*.

II.4. Fabrication de microfibres d'hydrogel chargées en cellules

Le travail de Kalisky *et al.* présente une méthode de fabrication de microfibres d'hydrogel chargées en cellules dont l'application concerne initialement le développement de fibres osseuses et non de microcapillaires rénaux.

Un microcapillaire de verre est successivement trempé dans des bains de solution de chlorure de calcium et d'alginate de sodium pour former une gaine d'alginate. Une solution mêlant hydrogel de collagène et cellules est ensuite injectée à l'intérieur de cette gaine tout en retirant simultanément le microcapillaire de verre. La gélification de l'hydrogel de collagène est obtenue 24 heures après. Après ce délai, la gaine d'alginate est mécaniquement retirée ce qui évite l'utilisation d'un traitement enzymatique et réduit ainsi les dommages cellulaires. Cette méthode aboutit à la formation d'une microfibre d'environ 200 µm de diamètre et de 3 cm de long. Kalisky *et al.* utilisent des cellules tdTomato se différenciant ensuite en lignée ostéoblastique¹ pour des applications d'ingénierie tissulaire osseuse [66].

Cette méthode a ensuite été adaptée par Flegeau *et al.* pour fabriquer une microfibre glomérulaire de structure cœur-écorce. Le cœur est constitué d'un hydrogel de collagène et l'écorce d'une couche bicellulaire avec des cellules endothéliales glomérulaires sur le versant interne et des podocytes sur le versant externe. Du collagène IV est détectée par des techniques d'immunofluorescence à l'interface des deux couches cellulaires. La présence de collagène IV témoigne de la formation d'une néomembrane glomérulaire. En effet, l'interaction et la coopération cellulaire entre les CEG et les podocytes induisent la formation de collagène IV à leur interface. Des analyses par PCR, Western Blot et par PCR quantitative ont confirmé la sécrétion de collagène IV ainsi que de laminine et de nidogène à l'interface des deux types cellulaires [67]. Cette dernière méthode permet la mise en forme de microfibres glomérulaires avec un diamètre externe micrométrique. Cependant, les fibres obtenues sont des fibres à cœur plein, rempli d'hydrogel de collagène, ce qui empêche leur perfusion et limite leur utilisation comme modèle vasculaire. Pour utiliser ces microfibres comme modèle perfusable, il est nécessaire de créer une lumière interne à travers le collagène au centre. La création d'un canal intravolumique au sein d'un tissu mou et transparent est un challenge pouvant être relevé par l'utilisation de lasers ultracourts.

¹ Les ostéoblastes sont des cellules jeunes osseuses qui participent à la construction de l'os et peuvent se différencier en ostéocytes.

Ainsi, les travaux de cette thèse reposent sur l'utilisation de lasers ultracourts pour créer une lumière interne à l'intérieur des microfibres selon le protocole de Flegeau *et al.* [67]. Les protocoles expérimentaux de ces deux techniques seront développés plus en détail dans le chapitre II « Mise au point des protocoles expérimentaux ».

III. Interaction laser-matière

L'élaboration de notre modèle de vascularisation glomérulaire s'est basée sur les travaux de Kalisky *et al.* [68] et de Flegeau *et al.* [67] présentés au paragraphe précédent. Le modèle aboutit à une microfibre pleine dont le cœur est intégralement occupé par l'hydrogel de collagène de type I. Afin d'éviter ce collagène, nous nous sommes tournés vers l'utilisation d'un faisceau laser à impulsions ultrabrèves pour dégrader la matière sans endommager les cellules.

III.1. Utilisation des lasers pour le biomédical

Depuis leur création en 1960, les lasers ont très vite été utilisés pour des applications médicales. La première opération ophtalmologique fut réalisée par Campbell seulement un an après son invention tandis qu'en 1963 Léon Goldman utilisait déjà la technologie laser pour traiter différents problèmes cutanés. Certaines de leurs propriétés rendent les lasers particulièrement adaptés pour des applications biologiques. Ils sont rapides, précis et relativement peu invasifs, limitant ainsi les risques infectieux et facilitant la cicatrisation des tissus. Leurs effets peuvent être modulés selon les types de laser utilisés et les paramètres d'irradiation choisis. En sélectionnant les grandeurs d'un ensemble de paramètres tels que la longueur d'onde, la durée d'impulsion ou encore la fluence - quantité d'énergie par unité de surface - différents effets thérapeutiques peuvent être obtenus pour une grande variété d'applications. Par exemple, l'exérèse de tumeurs cutanées se fait aujourd'hui avec un laser continu à CO₂. Ce laser permet ici de retirer les couches minces supérieures sans pénétrer profondément la peau à l'aide d'un processus thermique [69]. Par opposition, l'utilisation d'un laser Nd:YAG transmis par fibre optique dans le canal opérateur d'un endoscope, peut venir traiter certains types de cancer situés dans des zones difficilement accessibles comme la gorge, le foie ou la prostate [70].

Aussi bien utilisé pour le traitement thérapeutique que le diagnostic médical, le laser est également un outil indispensable dans la recherche biomédicale et en ingénierie tissulaire. Par exemple, son utilisation est largement répandue pour la bioimpression où on vient déposer une bioencore couche par couche selon un motif 3D prédéfini par ordinateur. Cette bioencore

contient des constituants biologiques tels que des cellules, des éléments nutritifs, un gel ou des composants de la matrice extracellulaire. En bioimpression assistée par laser, l'impulsion laser est ciblée sur une fine cartouche de bioencres. En entrant en contact avec cette cartouche, l'impulsion laser est absorbée et une microgouttelette de bioencres est projetée sur un support récepteur. L'utilisation du laser permet ici d'imprimer des tissus rapidement avec une grande résolution. Un muscle squelettique, du cartilage et un calvarium ont été imprimés à échelle humaine par Kang *et al.* tout en conservant leur intégrité structurelle [71]. Fricain *et al.* ont également imprimé *in situ*, via cette technique, des cellules osseuses pour améliorer et mieux contrôler la réparation osseuse *in vivo* [68].

En ingénierie tissulaire, l'environnement tridimensionnel des tissus joue sur le fonctionnement, la différenciation ou encore l'adhésion des cellules [72–74]. Les lasers sont de ce fait des outils essentiels pour contrôler et usiner l'architecture tridimensionnelle de cet environnement. Par exemple, des nanostructures favorisant l'adhésion et l'alignement cellulaire sont formées par laser en surface de différents matériaux. En exposant du titane ou de l'oxyde de titane à un faisceau laser avec une fluence proche du seuil d'ablation, des nanostructures périodiques appelées LIPSS - Laser-Induced Periodic Surface Structures - sont générées à la surface du matériau [75]. Pour des applications en ingénierie tissulaire, l'équipe de Pérez *et al.* ont réalisé ce même type de structure à la surface de polymères biodégradables naturels comme du chitosane à l'aide d'impulsions nanosecondes (ns) [76–78].

Ces dernières années, le développement des technologies laser, et notamment la réduction de la durée d'impulsion, a permis de multiplier ses applications dans la recherche biomédicale. Les lasers à impulsions ultracourtes se révèlent notamment des outils indispensables pour réaliser des modifications très précises dans le volume de tissus vivants sans impacter le milieu environnant.

III.2. Principes physiques du micro-usinage par laser de tissus mous et transparents

Le développement de lasers à impulsions ultracourtes offre aujourd'hui la possibilité de générer des modifications internes dans le volume de matériaux transparents via un phénomène d'absorption non linéaire localisée au point focal laser. Lorsqu'un matériau transparent est soumis à une illumination intense à l'aide d'un tel laser, des modifications intravolumiques peuvent avoir lieu dans le volume sans impacter la surface du matériau. Ce procédé est possible grâce au phénomène d'absorption multiphotonique (AMP) [79–81].

III.2.1. Principe de l'absorption multiphotonique

Lors de l'exposition d'un matériau à une impulsion laser, si l'énergie du photon lumineux est suffisante pour franchir la différence d'énergie entre la bande de valence et la bande de conduction, un électron appartenant à la matrice du matériau absorbe le photon lumineux incident et devient excité en passant dans la bande de conduction. Il s'agit d'une absorption linéaire comme illustré sur la Figure 9.

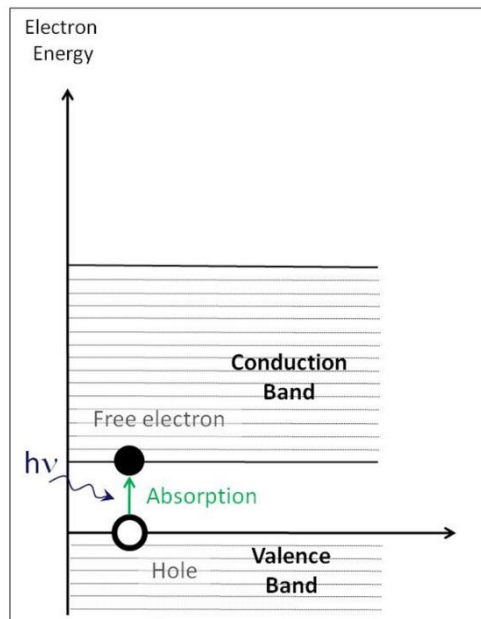


Figure 9 Diagramme de Jablonski illustrant les principes de l'absorption linéaire.
Crédit : John Lopez, support de formation ALPhANOV.

Pour une longueur d'onde donnée, si l'énergie du photon lumineux n'est pas suffisante pour franchir ce gap énergétique, on dit que le matériau est transparent à cette longueur d'onde. Cependant, l'absorption reste possible si plusieurs photons de faible énergie arrivent simultanément sur une zone restreinte du matériau. Les photons cumulent alors leur énergie pour franchir le gap énergétique et sont absorbés simultanément. On parle d'**absorption multiphotonique (AMP)** (Figure 10).

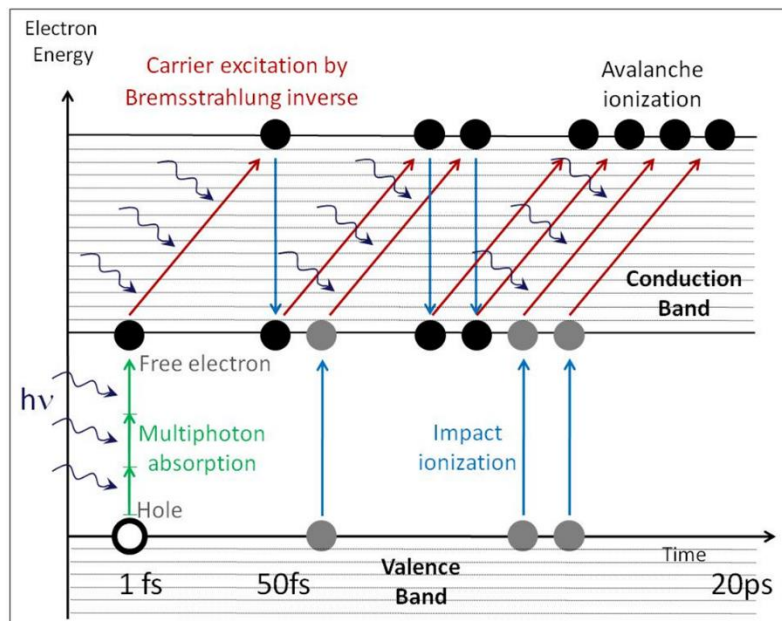


Figure 10 Diagramme de Jablonski illustrant les principes de l'absorption non linéaire.
Crédit : John Lopez, support de formation ALPhANOV.

L'AMP permet ainsi d'usiner le volume de matériaux transparents. Dès que des électrons sont excités sur la bande de conduction par AMP, ils peuvent ensuite générer de nouveaux électrons libres par un procédé appelé absorption inverse dite de Bremsstrahlung. Après avoir franchi le gap énergétique, l'électron excité de la bande de conduction continue d'engranger de l'énergie cinétique en absorbant d'autres photons incidents. Lorsqu'il a accumulé suffisamment d'énergie cinétique et qu'il rentre en collision avec un autre électron de la bande de valence, il lui transfère une partie de son énergie, l'ionisant à son tour. Après collision, les deux électrons se retrouvent sur la bande de conduction - tous deux excités - avec une énergie cinétique quasi-nulle. Puis, ils peuvent de nouveau accumuler de l'énergie cinétique en absorbant des photons incidents pour ensuite exciter deux nouveaux électrons, puis quatre et ainsi de suite. On parle d'**ionisation en cascade**. La densité électronique (densité d'électrons excités) au point focal laser augmente, menant à la formation d'un plasma dans le volume focal. Ce plasma généré est un nuage gazeux constitué d'ions et d'électrons libres et permet de modifier les propriétés du matériau transparent au niveau du point focal laser.

Pour générer un tel plasma, il faut donc déposer suffisamment de photons au même endroit et au même moment pour générer une AMP. Pour obtenir une densité de photons suffisante au point focal laser, il est nécessaire de concentrer fortement l'intensité lumineuse soit dans le temps, soit dans l'espace. Cela est possible avec un laser à impulsion femtoseconde (10^{-15} s) (confinement temporel) combiné à une grande ouverture numérique (confinement spatial). L'ouverture numérique (ON) d'un objectif de focalisation correspond à l'ensemble des angles pour lesquels l'objectif est capable de capter ou d'émettre les rayons lumineux. Il est défini selon la formule suivante :

$$ON = n \times \sin \alpha$$

où n est l'indice de réfraction du milieu en sortie de l'objectif ($n_{\text{air}} = 1$) et α est l'angle de demi-ouverture qui correspond à l'angle entre l'axe optique et le rayon le plus écarté de l'axe optique entrant dans l'objectif (Figure 11).

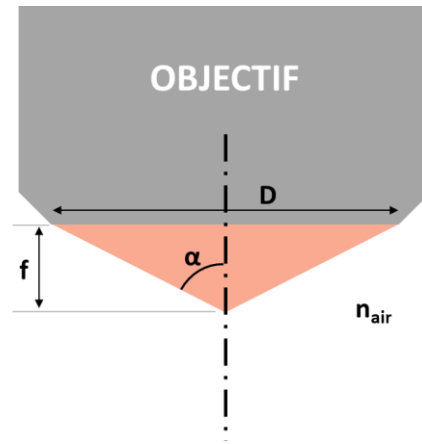


Figure 11 Schéma illustrant un objectif focalisant avec une forte ouverture numérique. Ici, D représente le diamètre de la pupille d'entrée, f est la distance de focalisation de l'objectif, α est l'angle de demi-ouverture et n_{air} est l'indice de réfraction du milieu.

L'ON est souvent calculée en considérant que l'angle de demi-ouverture est suffisamment petit pour faire l'approximation suivante :

$$ON = \sin \alpha \simeq \tan \alpha \simeq \alpha \simeq \frac{D}{2 \times f}$$

où D est le diamètre d'entrée de la pupille, f la distance de focalisation de l'objectif et $n_{\text{air}} = 1$ dans l'air.

Une grande ouverture numérique combinée à un laser à impulsions ultracourtes permet ainsi de reproduire les conditions de formation d'un plasma en créant un point focal laser très petit, de forte puissance crête - puissance d'une seule impulsion – dans une zone spécifique.

En revanche, la fluence – quantité d'énergie par unité de surface - en dehors du volume focal n'est pas suffisante pour générer une AMP et donc un plasma. Cette propriété permet d'usiner ou de modifier les caractéristiques d'un matériau localement et sélectivement dans son volume sans impacter l'environnement autour du point focal laser comme illustré sur la Figure 12.

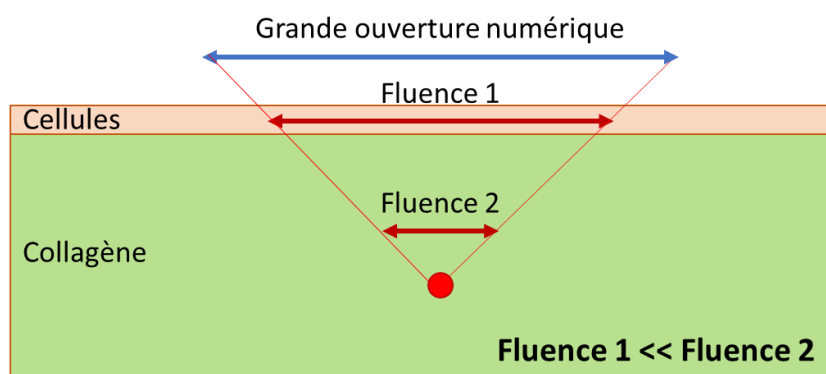


Figure 12 Une impulsion femtoseconde focalisée avec une grande optique numérique permet d’usiner le volume d’un matériau transparent (ici le collagène) sans impacter les couches supérieures (ici la surface cellulaire).

Par ce procédé non linéaire, Ding *et al.* ont réalisé des modifications de l’indice optique de réfraction dans le volume de polymères [82]. En ophtalmologie, l’absorption non linéaire par impulsions femtosecondes est de plus en plus utilisée comme alternative au microkératome mécanique permettant la découpe du volet supérieur de la cornée lors des opérations de chirurgie réfractive - correction de la myopie, de l’astigmatisme ou de l’hypermétropie. La technique LASIK (Laser ASSisted In situ Keratomileusis) permet ainsi la découpe du capot cornéen en produisant une bulle de gaz par impulsion laser dans le collagène de la cornée, transparente à l’impulsion laser. Ces bulles servent ensuite de prédécoupe pour retirer le capot cornéen mécaniquement selon la technique de découpe en timbre-poste [83].

La formation de bulles de gaz lors du LASIK est un phénomène courant appelé cavitation. Le phénomène de cavitation génère des bulles difficilement contrôlables qui peuvent être délétères pour les tissus vivants. En revanche, la cavitation est parfois déclenchée volontairement pour certaines applications, comme lors du LASIK ou lors de notre application où les bulles formées viennent générer une lumière à l’intérieur d’un microvaisseau rempli d’hydrogel.

III.2.2. Cavitation induite par laser

La cavitation est définie comme la formation et l’évolution d’une bulle de gaz ou de vapeur dans un liquide soumis à un fort gradient de pression [84]. Ces bulles s’effondrent lorsque le gradient disparaît.

Le phénomène de cavitation peut notamment intervenir lorsqu’un liquide ou un matériau riche en eau (comme les hydrogels) est soumis à une illumination laser suffisamment intense, un plasma peut se former par ionisation du volume focal. La génération du plasma crée une montée en température et en pression du matériau en quelques picoseconde (10^3 fs), induisant un étirement élastique de la matière et la formation d’une bulle de vapeur au niveau

du point focal [85]. La bulle se dilate ensuite dans toutes les directions jusqu'à atteindre une taille maximale critique où la pression à l'intérieur de la bulle est égale celle à l'extérieur. La bulle entame alors une phase d'effondrement.

Dans les liquides et les matériaux peu visqueux, les bulles formées effectuent des rebonds (alternance entre phase de dilatation et phase de décroissance) jusqu'au collapsus final. Chacun de ces rebonds s'accompagne de la libération d'une onde de choc. Les rebonds se poursuivent jusqu'à ce qu'il ne reste plus que des gaz incondensables qui finiront par se dissoudre [86]. La disruption de la matière provient alors des effets mécaniques - cavitation et onde acoustique - déclenchés par absorption multiphotonique [87]. L'onde de choc produit des tensions de traction participant à la rupture du liquide tandis que les pressions internes augmentent l'expansion de la cavité formée [85].

Cependant, lorsque le matériau s'apparente à un gel solide et amorphe, les bulles formées sont contenues par le matériau environnant. La vitesse de dilatation et d'effondrement sont ralenties, limitant ainsi les rebonds. La cavitation en milieux gélatineux reste aujourd'hui peu étudiée à ce jour. En effet, le seuil énergétique de cavitation de l'eau est similaire à celui du milieu oculaire et à celui d'autres tissus biologiques [87–89]. Beaucoup d'études se sont ainsi concentrées sur la cavitation induite par laser dans l'eau afin de simplifier le protocole expérimental. Alors que la répartition énergétique et la phase initiale de formation et d'expansion des bulles sont indépendantes de la viscosité, les différences des propriétés élastiques des matériaux limitent la taille des bulles formées et conduisent à des différences en termes d'évolution des bulles, du nombre de rebonds et par conséquent des effets disruptifs sur la matière [90].

Bien que souvent délétère pour les cellules dans les milieux organiques, le phénomène de cavitation peut toutefois être utilisé pour générer des motifs dans le volume de matériaux biologiques transparents comme les hydrogels.

III.3. Applications à l'usinage de canaux intravolumiques dans les hydrogels

Pour répondre aux problématiques de vascularisation, ce projet s'appuie sur les phénomènes de cavitation induits par laser ultracourts pour réaliser des canaux à l'intérieur d'une microfibre remplie d'hydrogel de collagène.

Dans la littérature, de nombreuses études se sont consacrées à l'obtention de canaux à l'intérieur d'une grande variété d'hydrogels. La majorité de ces études a opté pour des hydrogels synthétiques ou dérivés de protéines animales ou végétales. Ces hydrogels sont choisis pour leurs propriétés optiques et mécaniques facilitant leur usinage, leur robustesse,

leur intégrité mécanique, leur bonne homogénéité optique ou encore leur faible coût. Les matériaux synthétiques peuvent en plus être fabriqués avec un grand niveau de contrôle.

III.3.1. Usinage d'hydrogels synthétiques ou dérivés de protéines animales ou végétales

Dans l'optique de générer un réseau microvasculaire dense et entremêlé, similaire aux réseaux animaliers, Heintz *et al.* ont utilisé un hydrogel synthétique de diacrylate de polyéthylène glycol (PEGDA). Le PEGDA est un polymère synthétique dépourvu de protéines et possède donc une faible absorption biphotonique. Ils ont reproduit le réseau microvasculaire du cortex cérébral d'une souris à l'aide d'un laser en infrarouge proche (790 nm), de durée d'impulsion de 140 fs et d'une fluence de $3,77 \text{ J.cm}^{-2}$. Deux passages laser décalés l'un de l'autre de $1 \mu\text{m}$ selon la profondeur du matériau, sont nécessaires pour parvenir à la formation d'un canal complet. La génération de canaux intravolumiques est due ici à l'expansion thermoélastique à l'origine des phénomènes de cavitation due à la formation d'un plasma. La bonne intégrité du PEGDA permet l'usinage d'un réseau vasculaire très dense et tortueux à l'intérieur d'un faible volume d'hydrogel [91].

Applegate *et al.* se sont intéressés à la soie produite par le ver à soie du papillon Bombyx Mori. Ils ont usiné des structures en trois dimensions dans le volume d'un hydrogel dérivé de ces protéines de soie. Cet hydrogel a été choisi pour sa faible absorbance optique et sa grande robustesse. Au moyen d'un laser ultracourt (100 fs) avec de très faibles énergies par impulsions ($< 2 \text{ nJ}$), ils ont pu former différentes structures tridimensionnelles jusqu'à 1 cm de profondeur. L'utilisation d'une cadence élevée à 80 MHz a permis de créer une forte accumulation thermique au point focal laser, menant à la disruption des fibres de soies et créant ainsi une cavité [92].

Ces matériaux sont choisis spécifiquement pour réaliser facilement des structures intravolumiques. Toutefois, leur utilisation est limitée par leur manque de biocompatibilité et leur manque d'interaction naturelle favorable pour les tissus et les cellules humaines.

III.3.2. Usinage d'hydrogels présent dans la matrice extracellulaire

Le choix de matériaux issus de la matrice extracellulaire humaine, comme le collagène, offre la possibilité de réaliser des hydrogels dont les propriétés sont très proches des tissus vivants et avec une très bonne biocompatibilité.

III.3.2.1. Présentation du collagène

Le collagène est une protéine de la matrice extracellulaire parmi les plus abondantes. Il est sécrété par les cellules et interagit avec ces dernières via des récepteurs spécifiques régulant de nombreuses fonctions cellulaires comme la prolifération, la migration ou l'alignement cellulaire [93]. L'interaction du collagène avec les cellules est également un phénomène important lors du processus de remodelage des tissus adultes. Il induit en effet la différenciation et le phénotype cellulaire [94, 95]. Le collagène est également biocompatible et possède une faible immunogénicité - capacité d'induire une réaction immunitaire. Pour ces raisons, il est couramment utilisé comme structure de support cellulaire en ingénierie tissulaire.

Pour comprendre les mécanismes de dégradation du collagène par laser il est important de connaître sa structure tridimensionnelle particulièrement, illustrée sur la Figure 13.

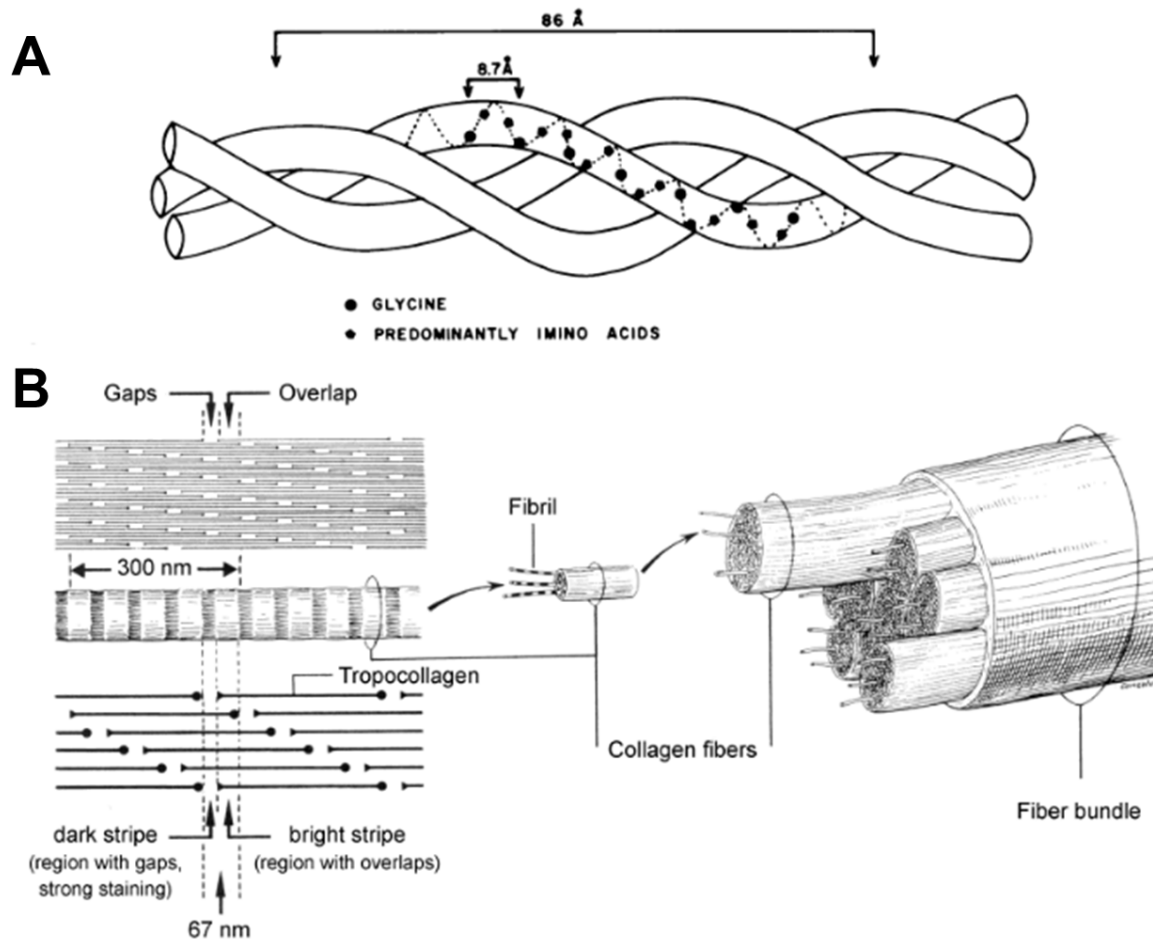


Figure 13 A) Schéma de la triple hélice de collagène formant une molécule de tropocollagène. B) Organisation spatiale du collagène fibrillaire, de la molécule au tissu [96].

Le collagène est composé de trois chaînes hélicoïdales gauches α enroulées hélicoïdalement en sens inverse (sens droit) pour former une molécule de tropocollagène. La plupart des collagènes sont de types fibrillaires. Dans cette structure, les molécules de tropocollagène sont associées par six selon la Figure 13 – **B**, pour former des fibrilles stabilisées par des liaisons covalentes réticulées. Ces fibrilles sont ensuite associées entre elles pour former des fibres de collagène dont le diamètre varie en fonction des types de tissus. Cette structure tridimensionnelle particulière lui confère une grande résistance mécanique. Elle contribue à créer un cadre structurel pour différents types de tissus et organes. La réticulation entre ses molécules est un prérequis pour que les fibres de collagène résistent aux contraintes physiques auxquelles les tissus sont exposés.

Les types de collagène diffèrent par la séquence d'acide aminés des chaînes α et leur structure tridimensionnelle. Nous nous intéressons à deux types de collagènes : le collagène I de type fibrillaire et le collagène IV qui forme des feuilletés réticulés et que l'on retrouve dans la membrane basale glomérulaire. Le Tableau 1 présente les principales caractéristiques de ces deux types de collagène tandis que la Figure 14 illustre leur forme structurale.

Tableau 1 : Caractéristiques principales des 2 types de collagène mentionnés dans cette thèse : le collagène de type I et le collagène de type IV. Les chaînes $\alpha 1$ et $\alpha 2$ sont des chaînes d'acide aminés constituées majoritairement de Glycine et de Proline.

Type de collagène	Structure	Formule moléculaire	Présence dans les tissus
I	Fibrillaire	$[\alpha 1(I)]_2\alpha 2(I)$	90 % du collagène dans le corps humain (Os, peaux, tendons, ligaments, cornée)
IV	En réseau sous forme de feuillet	$[\alpha 1(IV)]_2\alpha 2(IV)$	Lame basale

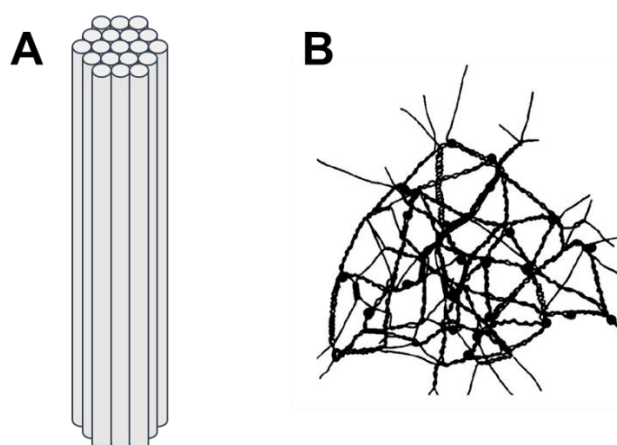


Figure 14 Structure A) fibrillaire du collagène de type I et B) en réseau du collagène de type IV.

Le collagène est une molécule hydrophile. Dans les tissus mous, les molécules d'H₂O se retrouvent piégées par une liaison hydrogène à l'intérieur de la triple hélice. Ainsi, un hydrogel de collagène riche en eau et un collagène sec n'auront pas les mêmes propriétés physiques et optiques. L'interaction laser-collagène sera différente en fonction de la quantité d'eau ajoutée.

Pour la bioingénierie, le collagène est une protéine souvent utilisée en raison notamment de son excellente biocompatibilité. En revanche, il possède quelques inconvénients. Il s'agit d'une matière coûteuse car difficile à extraire. Il forme un hydrogel inhomogène avec une grande turbidité et très sensible à son environnement extérieur. Lors de son utilisation il convient donc de le manipuler en prenant compte des différentes contraintes extérieures comme la

température et le taux d'humidité. De plus, le collagène fibrillaire est un matériau susceptible d'être remodelé lors de l'interaction cellule/collagène. En effet, le collagène possède des sites d'interactions cellulaires spécifiques venant se fixer sur les molécules transmembranaires d'adhérence intégrine $\alpha_2\beta_1$ [97, 98]. Ces structures d'adhérence jouent un rôle prépondérant dans la morphologie et le remodelage tissulaire. A la suite de ces remaniements, certaines propriétés du collagène peuvent évoluer [99].

Spectres d'absorption du collagène et de son hydrogel :

Le spectre d'absorption du collagène et de l'eau sont représentés sur la Figure 15 [100]. L'analyse de ce spectre permet d'identifier un haut pic d'absorption dans le lointain infrarouge vers 5000 nm correspondant à un coefficient d'absorption de 10^4 cm^{-1} . Dans une moindre mesure, le collagène absorbe aussi dans le visible et le proche infrarouge (650 – 1000 nm) avec un coefficient supérieur à 10^2 cm^{-1} .

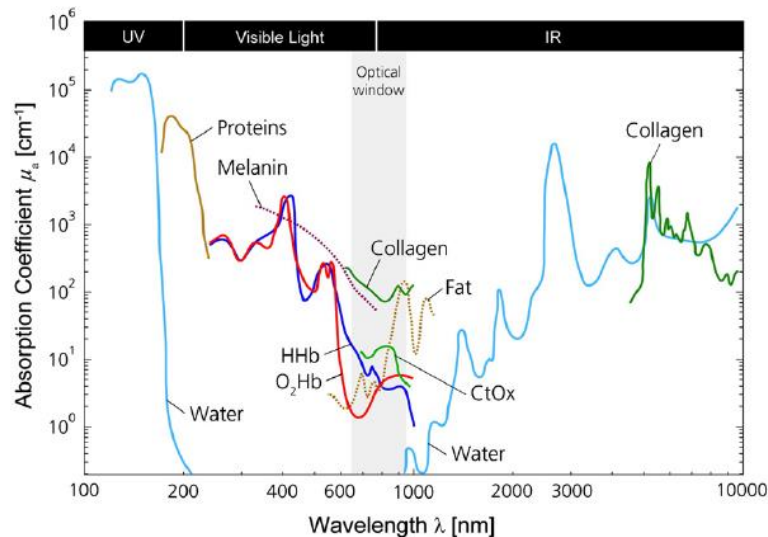


Figure 15 Spectre d'absorption de différents chromophores présents dans les tissus humains entre 100 nm et 10 µm (en échelle logarithmique). Le spectre du collagène apparaît en vert et celui de l'eau en bleu ciel [100].

A l'aide d'une technique de spectroscopie de diffusion en temps résolu, Taroni *et al.* ont pu tracer le spectre d'absorption du collagène I à partir de 600 nm et l'étendre jusqu'à 1100 nm. Ce spectre (Figure 16) montre la présence d'un pic d'absorption entre 1020 et 1040 nm. Ces résultats sont intéressants car il suggère qu'une amélioration de l'absorption est possible en utilisant des sources laser industrielles de longueur d'onde 1030 nm. Il faut toutefois être vigilant avec ces résultats. En effet, ce spectre représente les capacités d'absorption du collagène I bovin et, à ce jour, aucune corrélation entre espèce n'a été démontrée concernant les propriétés optiques et d'absorption du collagène.

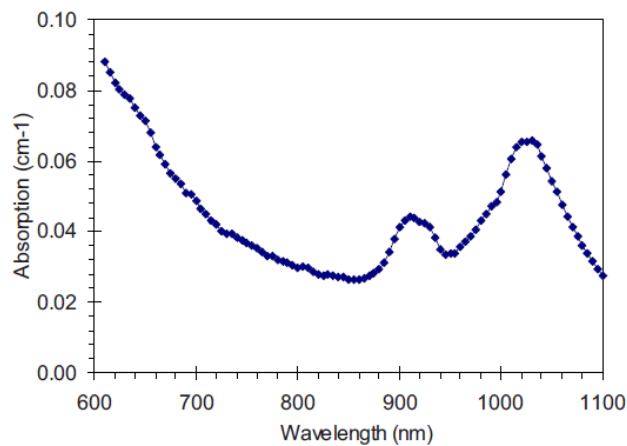


Figure 16 Spectre d'absorption du collagène I entre 600 et 1100 nm [101].

Finalement, l'hydrogel de collagène est un matériau riche en eau. En raison des propriétés hydrophiles du collagène, les molécules d'H₂O se retrouvent piégées entre les triples hélices et les fibrilles des molécules de collagène. Le spectre de l'hydrogel de collagène est donc fortement influencé par celui de l'eau. L'eau est majoritairement absorbante dans le domaine de l'ultraviolet (jusqu'à 200 nm, Figure 15). Son absorption est quasi-nulle dans le visible et remonte progressivement à partir de 1000 nm pour dépasser 10^2 cm^{-1} dans le moyen et lointain infrarouge. Ainsi, dans le visible et le proche infrarouge, les capacités d'absorption de l'hydrogel de collagène serait diminuée par la présence des molécules d'eau piégées par liaisons hydrogènes au sein des molécules de collagène.

III.3.2.2. Interaction laser-collagène

Malgré la difficulté d'usiner le collagène, quelques études se sont tout de même intéressées à la génération de canaux à l'intérieur d'hydrogel de collagène en raison de ses propriétés biologiques intéressantes.

Smith *et al.* ont réalisé des nodules (cavités de taille légèrement inférieure au micromètre) dans le volume de blocs de collagène I (pureté à 75 %). Ils ont utilisé un laser Ti:Saphir délivrant des impulsions de 80 fs pour une longueur d'onde de 775 nm, un taux de répétition de 82 MHz et une fluence de $0,06 \text{ J.cm}^{-2}$. En raison de la grande turbidité du collagène due à la forte concentration d'utilisation, la formation de structure en trois dimensions est très rapidement limitée à une profondeur de 30 μm [102].

Pour contrer ces limitations de profondeurs, Hribar *et al.* ont enrichi l'hydrogel de collagène avec des nanobaguettes d'or (Figure 17). De cette façon, ils ont réalisé des canaux avec des impulsions 100 fs et une longueur d'onde de 800 nm pour un taux de répétition laser de 80 MHz. Avec seulement quelques nJ, ils sont parvenus à réaliser des canaux dans le volume du bloc d'hydrogel grâce à l'insertion de ces nanobaguettes d'or. Ces nanobaguettes créées

un pic d'absorption de l'hydrogel autour de 800 nm et convertissent l'énergie laser en chaleur conduisant à la dénaturation thermique du collagène. En l'absence de ces nanobaguettes aucune modification n'a été détectée pour les mêmes conditions lasers [103].

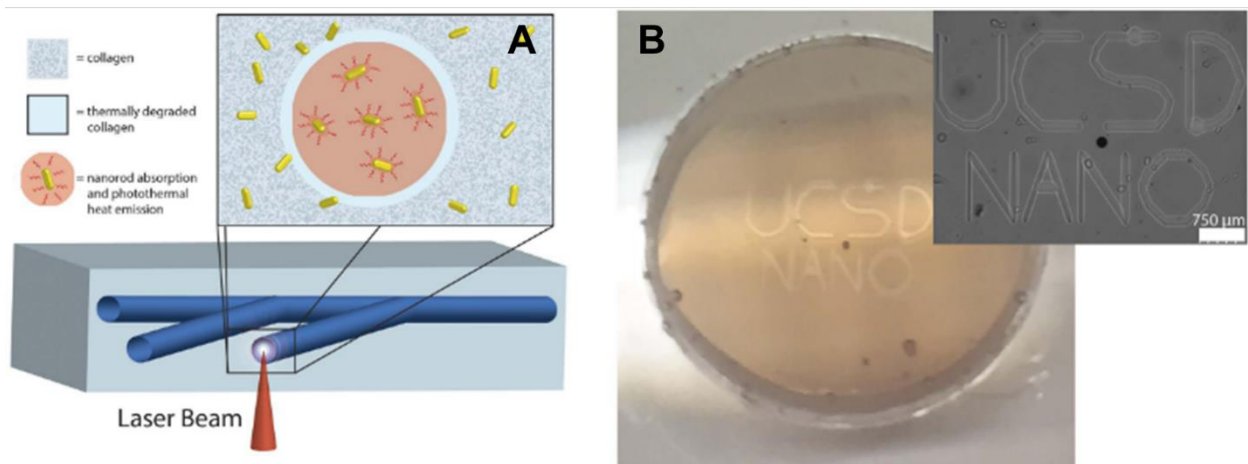


Figure 17 A) Des nanobaguettes d'or sont insérées à l'intérieur d'un bloc de collagène pour augmenter localement l'absorption afin de réaliser des canaux intravolumiques avec un laser proche IR. B) Photo et image en microscopie en lumière blanche du gel après usinage [103].

Brandenberg *et al.* ont quant à eux réussi à usiner des canaux intravolumique dans des hydrogels de collagène en utilisant un faisceau laser dans l'ultraviolet (UV) et un collagène bovin de type I moins turpide. Les canaux ont été creusés avec un laser nanoseconde (1 ns, 100 Hz, 355 nm). L'utilisation de l'UV conduit toutefois à la formation de canaux à de faibles profondeurs et nettement plus larges (70 μm de diamètre) [104].

III.3.2.3. Présentation de la gélatine

La gélatine est une protéine obtenue après dénaturation thermique du collagène impliquant la destruction de ses structures tertiaires et secondaires. Il s'agit donc d'un mélange de fragments protéiques formés des mêmes séquences d'acides aminés que le collagène. Sans structures tertiaires, la gélatine est plus soluble dans l'eau que le collagène [105]. Elle a ainsi la capacité de former des gels plus transparents et solides que le collagène non dénaturé. La gélatine est naturellement présente dans les tendons, les ligaments et d'autres tissus de mammifères. Elle possède une grande biocompatibilité et est à ce titre souvent utilisée comme revêtement de puits de culture cellulaire pour les cellules endothéliales, musculaires ou les cellules souches embryonnaires [106]. Son spectre d'absorption et ses propriétés diélectriques sont également comparables à ceux des matériaux vivants [89].

Spectres d'absorption de la gélatine et de son hydrogel :

Comme la majorité des protéines, la gélatine absorbe la lumière majoritairement dans l'ultraviolet entre 200 et 300 nm. Cook *et al.* ont pu mesurer l'absorption de la gélatine sur une

plage plus étendue allant jusqu'à 1300 nm (Figure 18). Ce spectre révèle la présence d'un premier pic d'absorption autour de 980 nm et d'un second plus important vers 1200 nm tandis que ses capacités d'absorption sont quasi nulles entre 400 et 900 nm. Ces résultats montrent que l'utilisation d'un laser IR centré autour de 980 nm ou 1200 nm permettrait d'optimiser l'absorption de l'hydrogel de gélatine lors d'un usinage intravolumique par laser ultracourt.

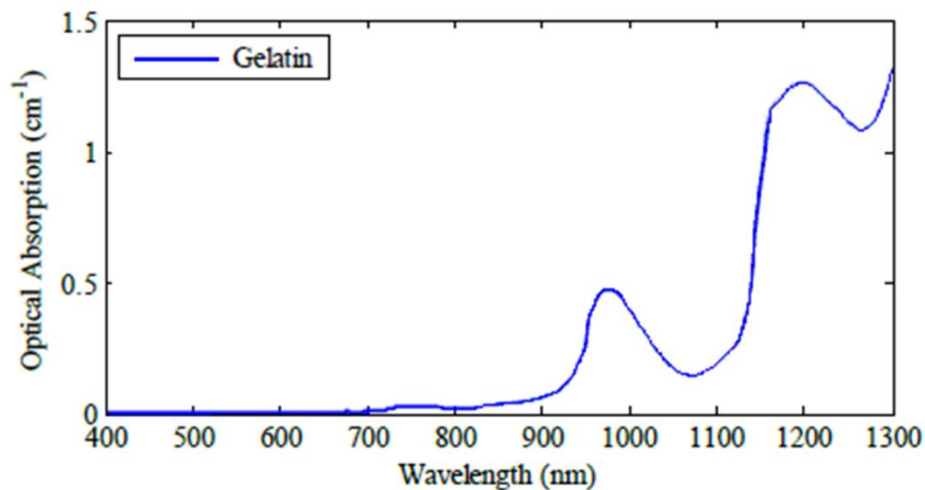


Figure 18 Spectre d'absorption de la gélatine entre 400 et 1300 nm [107].

Le spectre ci-dessus mesure l'absorption de la gélatine pure. Or, l'hydrogel de gélatine est un matériau dont la teneur en eau dépasse les 95 %. Ses propriétés optiques sont donc fortement influencées par celles de l'eau et son spectre d'absorption s'apparente celui de l'eau. Ainsi, l'eau est majoritairement absorbante dans le domaine de l'ultraviolet (jusqu'à 200 nm), majoritairement transparente dans le visible et redevient absorbante dans l'infrarouge et l'IR lointain avec notamment la présence de pic important à 3400 nm (Figure 15).

III.3.2.4. Interaction laser-gélatine

Parmi les études s'intéressant à l'usinage laser de gélatine avec un laser ultracourt, on peut citer celle de Gaspard *et al.* qui ont utilisé un laser de durée d'impulsion de 60 fs pour un taux de répétition de 11 MHz. En irradiant des films fins de gélatine avec un faisceau UV, ils observent la formation d'une couche surfacique de mousse nanoscopique tandis qu'ils obtiennent des cratères qui restent à la surface des films après une irradiation avec un faisceau vert ou un faisceau IR.

En réduisant la cadence de répétition à 1 kHz, Oujja *et al.* ont réalisé des voxels par laser fs dans un bloc de gélatine à 6,7 %. Les voxels ont été générés à l'aide d'un laser à 800 nm avec des impulsions 30 fs. Pour leurs conditions lasers et un objectif à ouverture numérique de 0,45, le seuil d'ablation de la gélatine a été observé à 150 nJ par impulsion [88].

III.4. Viabilité cellulaire lors de l'usinage des hydrogels

Dans notre application, le faisceau laser traverse une couche cellulaire formée de cellules endothéliales et de podocytes avant d'atteindre l'hydrogel à usiner situé derrière la couche cellulaire. Lors de la traversée du laser la viabilité de la couche cellulaire doit être conservée. Pour minimiser les dommages cellulaires lors de l'usinage, les effets du laser sur la viabilité cellulaire doivent être étudiés.

Le cas précis du suivi de la viabilité d'une couche de cellules denses et confluentes traversée par un faisceau laser non focalisé n'a pas encore été rapporté dans la littérature à ce jour. Cependant, quelques études se sont intéressées à la viabilité cellulaire au cours de diverses applications laser sur des tissus cellulaires faiblement peuplés.

L'étude de Brandenburg *et al.* consacre une partie de son étude sur la génération de canaux intravolumiques dans des hydrogels contenant des cellules encapsulées. L'interaction des cellules avec un laser nanoseconde en ultraviolet à 100 Hz n'a créé aucun changement de viabilité cellulaire 1 heure après l'usinage. Les cellules investiguées se trouvaient à 20 μm de la zone affectée [104].

De la même façon, l'équipe d'Applegate a réalisé des cavités de 5 μm de diamètre à l'intérieur d'un hydrogel de soie. Cet hydrogel était chargé en cellules souches mésenchymateuses humaines (hMSCs). L'hydrogel chargé en hMSCs a été usiné avec un laser d'une durée d'impulsion de 100 fs, une longueur d'onde de 810 nm, un taux de répétition de 80 MHz et une énergie par impulsion de 2 nJ. Des marqueurs fluorescents Live/Dead® ont été ensuite appliqués pour contrôler la viabilité cellulaire 4 heures après l'irradiation. Les résultats montrent que de nombreuses cellules sont mortes dans le plan focal mais des cellules vivantes sont présentes 76 μm en dessous et 62 μm au-dessus du plan focal. Les auteurs attribuent la mortalité cellulaire aux hautes températures produites par accumulation thermique par un taux de répétition de 80 MHz [92].

Les résultats très différents de ces deux publications sont à analyser avec précaution. Plus particulièrement, l'absence de mortalité cellulaire de la première étude ne veut pas dire que la viabilité cellulaire est meilleure avec un faisceau laser UV, une durée d'impulsion ns et une cadence de 100 Hz.

La durée après laquelle la viabilité cellulaire est testée semble un paramètre important à prendre en compte. Après irradiation laser, un nombre plus ou moins important de cellules peuvent mourir par nécrose. Cette nécrose cellulaire correspond à la mort accidentelle relativement rapide d'un groupement de cellules après perturbation laser. Les cellules toujours

en vie après irradiation laser ont toutefois subi un stress. Elles peuvent se remettre progressivement de ce stress et récupérer progressivement leur fonctionnalité ou déclencher l'apoptose. L'apoptose est la mort programmée d'une cellule permettant d'éliminer les cellules nuisibles et non fonctionnelles à l'intérieur d'un tissu. Ainsi, l'apoptose peut se déclencher plusieurs heures voire plusieurs jours après l'irradiation laser en fonction du type cellulaire [108]. Les suivis de viabilité cellulaire réalisés 1 ou 4 heures après irradiation laser sont donc bien souvent insuffisant et parcellaire.

Au cours des mesures de viabilité cellulaire, il est également important de prendre en compte la densité de cellules contenues dans l'hydrogel. Bien souvent la concentration des cellules piégées à l'intérieur des gels est faible. Le faisceau laser traverse ainsi l'hydrogel sans directement toucher les cellules, à une distance plus ou moins éloignées de ces dernières. Ces résultats restent cependant encourageants et démontre qu'une survie cellulaire est possible après interaction laser si les paramètres lasers sont optimisés. Les études suivantes présentent ainsi l'influence de quelques paramètres clés sur la viabilité cellulaire dans des contextes différents.

Influence de quelques paramètres clés :

Une première étude, réalisée par Zeigler *et al.*, a étudié la viabilité cellulaire et leurs changements morphologiques après irradiation de leur membrane plasmique. Ils ont comparé les effets d'une seule impulsion laser de 3 ns à 337 nm avec une série d'impulsions laser de 110 fs à 770 nm pendant 5 ms à 80 MHz. Les puissances des deux lasers ont été choisies afin d'observer la disruption de la membrane dans 50 % et 90 % des cas. L'intérêt majeur de cette publication est qu'elle suit la viabilité cellulaire, l'activité mitochondriale, la perméabilité de la membrane plasmique et les changements morphologiques des cellules dans les 12 heures suivant l'irradiation laser.

Les résultats montrent qu'une partie non négligeable des cellules meurent après irradiation laser soit par nécrose dans un délai court, soit par apoptose dans les 12 heures suivantes. L'ablation biphotonique par impulsion fs offre une amélioration significative de la viabilité par rapport à l'ablation à 1 photon avec un taux de survie après 12 heures de 79 % et 36 % respectivement comme illustrée sur la Figure 19 [109].

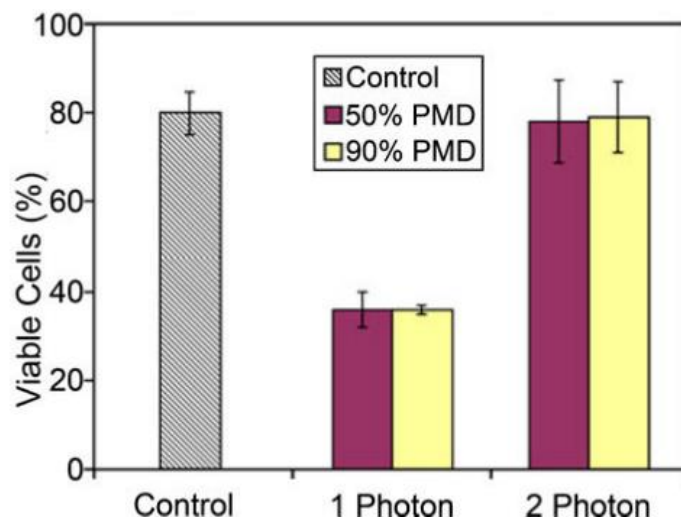


Figure 19 Viabilité cellulaire 12h après la disruption de la membrane cytoplasmique par laser. La viabilité cellulaire est significativement améliorée avec un laser fs (absorption à 2 photons) par rapport à un laser ns (absorption à 1 photon). En revanche lorsque la puissance est augmentée pour observer la disruption de la membrane dans 90 % des cas (contre 50 %) la viabilité n'est presque pas affectée [109].

Hribar *et al.* (paragraphe III.3.2.2.) ont étudié l'influence de la vitesse de déplacement et de la puissance laser sur la viabilité cellulaire lors de la création de microcanaux dans un bloc de collagène chargée en nanobaguettes d'or avec des impulsions fs IR.

En modifiant la vitesse de déplacement laser et la puissance laser, une augmentation de la viabilité des cellules contenues dans l'hydrogel a été observée. Les motifs réalisés avec les puissances les plus élevées (>200 mW) et les vitesses les plus lentes ont causé la plus grande mortalité cellulaire. A 100 mW, en augmentant la vitesse de 0,25 à 2 mm/s la viabilité cellulaire est passée de 45 % à 90 %. Le meilleur compromis entre la formation des canaux et le respect de la viabilité cellulaire a ainsi été trouvé à 100 mW et 2 mm/s. Cependant, le suivi de viabilité s'est fait immédiatement après l'usinage en prenant uniquement en compte la viabilité à court terme et non la mort cellulaire par apoptose, plus tardive [103].

OBJECTIFS DE LA THESE

Mon sujet de thèse s'intègre dans un projet dont l'objectif général est de développer un modèle d'étude de la physiopathologie glomérulaire *in vitro* en trois dimensions, perfusable. Ma thèse a pour but de créer une lumière à l'intérieur des microfibres glomérulaires à l'aide d'un procédé de micro-usinage avec un laser femtoseconde permettant ainsi de perfuser ces microfibres. L'usinage des microfibres s'inspire des méthodes d'usinage des matériaux transparents par processus non linéaires générés avec des impulsions ultracourtes fortement focalisées. Dans ce but, des objectifs spécifiques ont été déterminés :

- établir un protocole expérimental permettant de manipuler les fibres, de les usiner avec un laser femtoseconde et de les caractériser après usinage
- étudier les phénomènes d'interaction laser-matière dans des tissus mous, riches en eau et plus particulièrement d'étudier la formation de cavités intravolumiques dans ces matériaux suite à la génération de bulles de cavitation induites par laser
- déterminer une fenêtre de paramètres laser permettant de générer une lumière à l'intérieur des microfibres glomérulaires tout en préservant la viabilité cellulaire
- étudier l'influence des impulsions lasers sur la viabilité cellulaire d'un tissu usiné par laser

CHAPITRE II.

Mise au point des protocoles expérimentaux

Ce chapitre présente les étapes de mise au point des protocoles expérimentaux utilisés pendant ma thèse et leur aboutissement. Il s'articule en trois parties.

La première partie est consacrée au **développement d'un modèle expérimental** imitant le cœur d'hydrogel des microfibres. Ce modèle a permis dans un premier temps de comprendre les mécanismes de dégradation de l'hydrogel sous impulsions laser et d'optimiser les paramètres laser avant de les appliquer pour l'usinage des microfibres avec cellules. Cette partie détaille les démarches réalisées pour aboutir à ce modèle, les caractéristiques du modèle ainsi que les protocoles expérimentaux spécifiques pour son usinage et sa caractérisation après usinage laser.

La seconde partie s'intéresse aux **microfibres glomérulaires**. Ici sont détaillés les protocoles de culture cellulaire et de fabrication des microfibres, les caractéristiques physico-chimiques et physiologiques des fibres ainsi que les protocoles dédiés spécifiquement à leur usinage et à leur caractérisation après usinage laser.

Enfin, la dernière partie est dédiée à la **mise en place d'une station d'usinage laser** permettant de réaliser des canaux intravolumiques à l'intérieur du modèle expérimental et des microfibres cellulaires. Les étapes aboutissant au développement de cette station d'usinage et les choix des éléments optiques sont résumés ici.

I. Modèle d'étude de l'interaction laser-hydrogel

I.1. Fabrication d'un modèle d'étude

I.1.1. Pourquoi utiliser un modèle d'étude ?

Au-delà de la création de microfibres perfusables, l'enjeu de ces travaux est de faire cohabiter deux disciplines, le micro-usinage laser et la biofabrication 3D, chacune apportant son lot d'exigences et de contraintes. Lors d'un micro-usinage par laser, une multitude de paramètres doit être testée afin d'évaluer la réponse du matériau lors de l'usinage. L'influence de chacun de ces paramètres sur les mécanismes de dégradation du matériau est étudiée puis une fenêtre étroite de combinaisons de paramètres laser possibles est définie. Pour conduire une étude paramétrique, un grand nombre d'échantillons est requis afin de comprendre la réaction du matériau lors de la variation de la longueur d'onde, de l'énergie, de la durée d'impulsion, du taux de répétition, de la taille du faisceau laser *etc.*

Au contraire, la culture cellulaire et la biofabrication, requièrent quant à elles du temps et de la patience pour amener un modèle, souvent produit en très faible quantité, à son stade de maturation. En particulier, la mise en forme des microfibres nécessite 20 jours pour obtenir un modèle mature constitué de cellules différenciées, sans compter le temps de culture cellulaire en amont. Au bout de ces 20 jours, seulement une dizaine de fibres sont produites. De plus, sous l'action des cellules, l'hydrogel de collagène peut se contracter et certaines microfibres se mettent en boule. Ces boules ont des caractéristiques différentes que les microfibres non contractées et ne peuvent plus être utilisées pour l'étude paramétrique. Le nombre de fibres pouvant être produites est donc insuffisant pour conduire une étude paramétrique.

Pour permettre l'étude et la compréhension des mécanismes de dégradation de l'hydrogel par laser, j'ai élaboré un modèle expérimental, facile et rapide à obtenir. Ce modèle m'a permis de conduire une étude paramétrique consistante pour établir une fenêtre de paramètres laser réduite permettant de réaliser une lumière à l'intérieur des microfibres.

I.1.2. Cahier des charges

Le modèle a développé pour étudier l'interaction laser matière devait répondre à plusieurs contraintes :

- avoir un temps de fabrication court (2 jours maximum),
- être préparé suivant un protocole défini et reproductible,
- fait à partir de matière première disponible en quantité suffisante pour permettre l'étude de nombreux paramètres laser,
- fait avec un matériau stable dont les propriétés ne sont pas modifiées par un changement d'environnement modéré (transport des échantillons),
- avoir une structure proche de l'hydrogel de collagène afin de modéliser fidèlement l'interaction laser-collagène,
- être transparent au laser proche infrarouge afin d'usiner jusqu'à 100 μm de profondeur et travailler dans la fenêtre biologique,
- être biocompatible pour permettre le dépôt d'une couche de cellules par-dessus et étudier l'influence des cellules et leur viabilité lors de l'usinage.

I.1.3. Les essais

Pour élaborer un modèle d'étude pertinent, différents hydrogels ont été testés afin de fabriquer des blocs d'hydrogels modélisant le cœur d'hydrogel de collagène des microfibres. Pour chaque hydrogel testé, des blocs étaient dans un premier temps fabriqué sans cellule, puis dans un second temps, une couche de CEG étaient ensemencée par-dessus afin d'étudier l'influence de l'usinage laser sur la viabilité cellulaire.

Les différents hydrogels utilisés pour les blocs sont les suivants :

- un hydrogel de collagène à différentes concentrations : 2 mg/mL ; 5 mg/mL et 9 mg/mL,
- des mélanges de collagène et de gélatine avec différents pourcentages volumiques : 75/25 % ; 60/40 % ; 50/50 % ; 40/60 % et 20/80 % (collagène/gélatine),
- un hydrogel de gélatine à 2 %.

Pour chaque bloc fabriqué, avec ou sans cellule, sa pertinence comme modèle expérimental est évaluée tout d'abord en considérant les propriétés du bloc vis-à-vis du cahier des charges, puis en réalisant un usinage laser à l'intérieur du bloc et en comparant la réponse du bloc aux impulsions lasers avec celle des microfibres pour les mêmes paramètres laser.

1.1.3.1. Blocs d'hydrogel de collagène

Les premiers essais ont consisté à former des blocs d'hydrogels à partir de la même solution constituant le cœur de collagène des microfibres mais sans la présence de cellule.

Les blocs de collagène étaient préparés en ajoutant du collagène de type I issue de queue de rat (Corning Lab) dilué à 5 mg/mL dans une solution contenant de la soude à 1 mol/L (Sigma Aldrich), 1/10^{ème} du volume total de PBS 10X et de l'eau distillée pour compléter jusqu'au volume total de solution désirée. La solution était préparée à froid afin de maintenir le collagène liquide. La solution était ensuite versée dans un eppendorf puis homogénéisée doucement à l'aide d'une micropipette en évitant la formation de bulles d'air puis conservée dans de la glace. 500 µL de solution étaient ensuite déposés dans chaque puit d'une plaque de culture de 12 puits et incubés à 33 °C pour laisser le collagène gélifier. Différents temps d'incubation ont été testés variant de 30 minutes à 48 heures.

Après incubation, le collagène formait un léger dôme et ne séchait pas uniformément. Ces absences de planéité et d'homogénéité induisaient des aberrations sphériques importantes et modifiaient la réponse du matériau lors de l'interaction laser. Pour limiter ces aberrations seul le centre du dôme de collagène pouvait être usiné. Pour réaliser seulement quelques essais, une grande quantité de collagène était nécessaire avec un coût non négligeable.

Pour limiter les coûts, j'ai ensuite réduit la taille des blocs en coulant la solution dans des puits de seulement 60 µL de volume. Ainsi, pour réaliser une centaine d'essais $39 \times 100 = 3\,900$ µL de solution mère de collagène étaient nécessaires. Le principal inconvénient de ces plus petits blocs est qu'ils se déshydrataient rapidement. En effet, le collagène de type I se solidifie pour une température supérieure à 4 °C. Une fois solidifié, il peut sécher au contact de l'air. L'eau piégée dans la triple hélice s'évapore et l'hydrogel ne se gélifie plus. Pour éviter ce phénomène de déshydratation, différentes températures de gélification et de conservation du collagène ont été testées :

- incubateur à 33 °C : le collagène sèche en moins d'une heure,
- réfrigérateur à 4 °C : le collagène sèche en 24 heures sans jamais se gélifier,
- air ambiant : le collagène sèche avant de se gélifier.

J'ai ensuite essayé de protéger la solution avec un couvercle pour limiter le contact avec l'air :

- couvercle au contact de la solution : le collagène est aspiré et reste sur le couvercle lorsque ce dernier est retiré.
- Le puit de collagène est inséré dans une boîte légèrement plus grande fermée hermétiquement avec du Parafilm®. Malgré l'utilisation de cette boîte, le collagène sèche aussi rapidement que sans.

J'ai ensuite modifié la concentration du collagène. La solution à 2 mg/mL, riche en eau ne s'est jamais gélifiée et est toujours restée liquide tandis que la solution à 9 mg/mL n'a pas apporté de réelle amélioration par rapport à celle à 5 mg/mL mais coûtait près de 2 fois plus chère en matière première.

Face à l'impossibilité d'obtenir des blocs de collagène I gélifiés de faible volume, nous avons décidé d'ensemencer des cellules juste après avoir coulé le collagène pour aider l'hydrogel à se structurer. En effet, comme mentionné au paragraphe III.3.2.1 (chapitre I), l'interaction du collagène avec les cellules est un processus *in vivo* qui permet le remodelage des tissus adultes. Lors de ce processus, le collagène agit sur les cellules en induisant leur différenciation et en maintenant leur phénotype cellulaire tandis que le collagène est lui-même remanié par les cellules modifiant certaines de ses propriétés.

Pour fabriquer des blocs avec cellules, des blocs de 500µL d'hydrogel de collagène à 5mg/mL ont été préalablement préparés. Une solution de cellules endothéliales à 35 millions de cellules/mL était ensuite ensemencée sur le collagène. La solution cellulaire était préparée en trypsinant une lignée de CEG à confluence puis en les centrifugeant à 1100 tours par minute pendant 4 minutes. Après comptage cellulaire, 35 millions de cellules étaient suspendues dans 1 mL de milieu de culture EGM2 (Lonza). Quelques gouttes de cette solution étaient ensuite déposées sur les blocs d'hydrogels préparés juste avant. Après ensemencement, les plaques étaient entreposées à l'incubateur à 33 °C pendant 30 minutes, le temps que les cellules sédimentent et accrochent aux blocs. 2 mL de milieu de culture étaient ensuite ajoutés pour approvisionner les cellules.

L'ensemencement des CEG sur les blocs de collagène a permis d'obtenir la réticulation du collagène rapidement après le dépôt des cellules. Cependant, la réticulation obtenue n'était pas homogène et les blocs de collagène se contractaient et s'affinaient jusqu'à atteindre une épaisseur entre 10 et 30 µm. Ils se détachaient du support et se déchiraient lors du transport.

En résumé :

- Les quantités de collagène nécessaires sont trop importantes pour un coût de matière première trop élevé.
- Il est impossible de gélifier une faible quantité de collagène sans cellule.
- L'ajout de cellules permet la gélification du collagène mais son remaniement affine et fragilise les blocs.

Des essais lasers ont tout de même été réalisés sur ces films de collagène avec cellules afin d'observer la réponse du matériau lors de l'usinage. Les résultats sont présentés au paragraphe I.1.4.

I.1.3.2. Modèle collagène/gélatine

Pour pallier les problèmes précédents, j'ai mélangé le collagène avec la gélatine, produit issu de la dénaturation du collagène. La gélatine permet de former un gel plus stable et moins cher. L'idée était de faciliter la gélification avec ou sans cellules tout en diminuant la quantité requise de collagène pour réduire les coûts.

Pour réaliser des blocs de collagène enrichis en gélatine, deux solutions étaient préalablement préparées. La première était une solution de collagène préparée selon le protocole précédent. La seconde était une solution de gélatine à 2 % préparée en ajoutant 2 g de gélatine extraite de peaux porcines, type A (Sigma Aldrich), dans 100 mL d'eau distillée. Les cristaux de gélatine étaient ensuite dissous en remuant et chauffant la solution à 37 °C pendant 20 minutes.

Des blocs constitués de ces deux solutions ont été préparés avec différents pourcentages volumiques : 75/25 % ; 60/40 % ; 50/50 % ; 40/60 % et 20/80 % (collagène/gélatine). Par exemple, pour préparer des blocs de collagène/gélatine à 25/75 %, une solution de collagène à 5 mg/mL et une solution de gélatine à 2 % étaient préparées en amont. Pour fabriquer un volume V_{total} de solution collagène/gélatine à 25/75 %, 25 % de V_{total} de la solution de collagène étaient prélevés à froid puis injectés dans 75 % de V_{total} de la solution de gélatine chauffée. À l'aide d'une micropipette, les deux solutions étaient rapidement mélangées en faisant attention à ne pas former de bulles puis immédiatement coulées dans des puits de culture : 500 μL par puit d'une plaque de 12 puits. Les plaques étaient ensuite mises au repos pendant 24 heures. Différentes températures de repos ont été testées : au réfrigérateur à 4 °C, à température ambiante à 21 °C et dans l'incubateur à 33 °C.

Les solutions collagène/gélatine à 75/25 % ; 60/40 % ; 50/50 % ; 40/60 % et 20/80 % ont été préparées de la même façon en variant les pourcentages prélevés dans les solutions de collagène et de gélatine.

En dessous de 60 % de gélatine, la quantité de gélatine n'était pas suffisante pour observer une gélification du mélange avant que l'hydrogel soit totalement déshydraté. Entre 60 et 80 % de gélatine, le mélange commençait à se gélifier à température ambiante avec une très faible viscosité apparente. Ces mélanges restaient cependant hétérogènes en raison de la différence de température de transition de phase du collagène et de la gélatine. En effet, le collagène est liquide en dessous de 4°C et solide au-dessus alors que la gélatine liquide au-dessus de 25 - 30 °C et solide en dessous

Des CEG ont également étéensemencées sur chacun de ces blocs mais les cellules n'ont jamais adhéré et sont mortes. Bien que la gélatine soit couramment utilisée comme support cellulaire pour améliorer l'adhésion et la croissance cellulaire, nos problèmes d'adhésion peuvent s'expliquer soit par une concentration trop élevée de gélatine (2 % au lieu de 0,1 à 1 % de gélatine généralement utilisé en culture cellulaire), soit par un lot de gélatine dont les sites de fixations avec les $\alpha_2\beta_1$ intégrines ont été altérés lors de sa préparation.

Les mélanges à 60 et 80 % de gélatine sans cellule ont été ensuite usinés afin d'observer leur réponse aux impulsions ultracourtes pour valider ou non leur utilisation comme modèle. Les résultats sont présentés au paragraphe I.1.4. Choix du modèle final.

I.1.3.3. Hydrogel de gélatine

Finalement, des blocs fabriqués ont été réalisés à partir d'un hydrogel de gélatine à 2 %, sans collagène. Pour la préparation de la solution de gélatine, 2 g de gélatine de porc, type A (Sigma Aldrich), étaient ajoutés dans 100 mL d'eau distillée. Les cristaux de gélatine étaient ensuite dissous en remuant et chauffant la solution à 37 °C pendant 20 minutes. 3 mL de solution étaient coulés dans un puits d'une plaque 6 puits puis refroidi au réfrigérateur à 4 °C pendant toute la nuit. Les blocs obtenus étaient parfaitement gélifiés et homogènes après une nuit passée à 4 °C. La température de fusion de la gélatine étant de 25-30 °C, les blocs étaient conservés à 4 °C et transportés dans des boîtes isothermes avant les essais laser.

L'ensemencement des CEG sur les blocs de gélatine a été réalisé selon un protocole identique à celui décrit au paragraphe I.1.3.1., mais malgré de nombreux essais les cellules n'ont jamais adhéré aux blocs et sont mortes.

Les mélanges à 60 et 80 % de gélatine ont été sélectionnés pour être ensuite usinés afin d'observer leur réponse après interaction laser et valider ou non leur utilisation comme modèle. Les résultats sont présentés au paragraphe I.1.4. Choix du modèle final

I.1.4. Choix du modèle final

Parmi les blocs fabriqués aux paragraphes précédent, ceux qui semblaient être le plus en adéquation avec le cahier des charges, ont été ensuite usinés afin d'évaluer leur réponse aux impulsions ultracourtes pour contrôler leur pertinence comme modèle d'interaction laser-collagène.

Parmi ces blocs, des essais d'usinage laser ont été réalisés sur :

1. les films de collagène à 5 mg/mL avec une couche de CEG
2. les blocs de collagène/gélatine à 40/60 % acellulaire
3. les blocs de collagène/gélatine à 20/80 % acellulaire
4. les blocs de gélatine à 2 % acellulaire

La validation de ces 4 modèles repose sur les caractéristiques des bulles formées lors de l'interaction laser. En effet, lors de l'usinage des microfibres, des bulles de cavitation se forment. Elles apparaissent au point d'impact laser, grossissent puis se rétractent. Les plus petites bulles disparaissent rapidement tandis que les plus grosses mettent plusieurs heures pour disparaître. La forme, la taille et la dynamique de ces bulles dépendent des paramètres lasers et du matériau usiné. Pour déterminer la pertinence d'un modèle, j'ai donc choisi de comparer le comportement des bulles obtenues à l'intérieur des microfibres avec celles formées dans le volume des quatre modèles à l'essai pour des paramètres laser identiques. Lors de l'usinage des quatre modèles et de la microfibre, le laser suivait une trajectoire rectiligne de 500 μm de long dans le volume des échantillons avec les paramètres suivants : Durée d'impulsion : 350 fs ; Longueur d'onde : 1030 nm ; Energie par impulsion : 4 μJ ; Cadence de tir : 50 kHz ; Vitesse de déplacement des platines : 0,5 mm/s ; Ouverture numérique : 0,4 ; Profondeur de tir : 100 μm . Les paramètres suivants permettent d'obtenir des bulles de cavitation de taille moyenne à 100 μm de profondeur.

Description des usinages :

Usinage témoin sur microfibres : A l'intérieur des microfibres et après un unique tir laser, 2 à 3 bulles se sont formées avec un diamètre moyen de 66 μm . Le temps de vie des bulles observées étaient inférieures à 30 secondes pour les plus petites bulles et supérieure à 10 minutes pour les plus grosses. La Figure 20 - **A** montre les bulles de cavitations formées à l'intérieur des fibres, 5 secondes après la fin de l'usinage.

Modèle n°1 : Les blocs de collagène à 5 mg/mL avec cellules se contractaient après le remaniement par les cellules. Leur épaisseur variait entre 10 et 30 μm . Après usinage, aucune

bulle n'est observée dans ces films de collagène. A la place, une gravure nette apparaît et traverse de part et d'autre le film de collagène. Ce modèle n'a pas donné de suite.

Modèle n°2 et n°3 : Les essais réalisés sur les blocs formés d'un mélange collagène/gélatine à 40/60 % et 20/80 % respectivement ont abouti à des résultats similaires. Plus d'une vingtaine de bulles se sont formées autour du point d'impact avec un diamètre moyen de 19 μm . Le temps de vie des bulles observées était inférieur à 10 secondes après tir laser en raison de la faible viscosité du matériau.

Modèle n°4 : L'usinage des blocs de gélatine à 2 % a permis d'observer la formation de 3 à 5 bulles en moyennes à 100 μm de la surface. Le diamètre moyen des bulles formées était de 91 μm . Leur temps de vie était inférieur à 30 secondes pour les plus petites bulles, 5 minutes pour les bulles de taille moyenne tandis que les plus grosses bulles restaient piégées dans le volume de gélatine au minimum pendant 24 heures. Un exemple de ces bulles est présenté sur la Figure 20 - B.

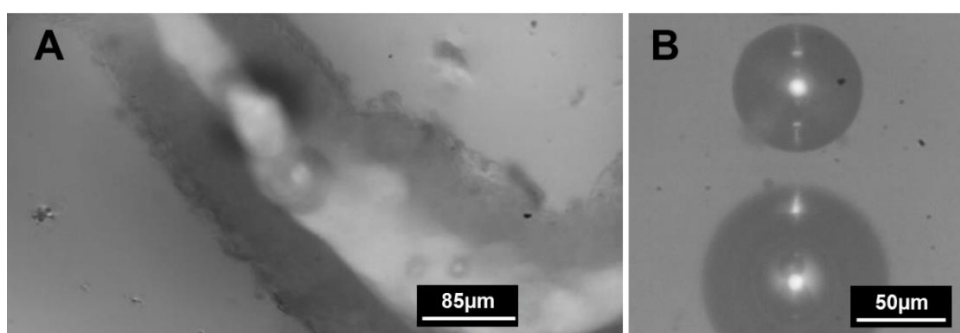


Figure 20 Bulles de cavitation formées par usinages laser fs A) dans un hydrogel de collagène de type I au centre d'une microfibre et B) dans le volume d'un bloc de gélatine à 2 % à 100 μm de profondeur. Photos prises par caméra CCD 5 secondes après usinage.

Les bulles de cavitation formées dans le modèle de gélatine à 2 % étaient les plus proches de celles obtenues dans les microfibres. Le modèle n°1 était trop fin pour pouvoir créer la moindre bulle et les modèles n°2 et n°3 n'étaient pas assez visqueux pour modéliser fidèlement le comportement des bulles de cavitation et permettre la création de canaux intravolumiques durables.

Aux vues de ces données, il a été choisi le modèle de gélatine à 2 % sans cellule pour modéliser l'interaction laser-hydrogel. La préparation des blocs est facile et rapide et la gélatine est une matière très peu coûteuse ce qui permet de réaliser un grand nombre d'essais laser. Le Tableau 2 dresse le bilan des quatre modèles à l'essai par rapport au cahier des charges détaillé au paragraphe I.1.2. La validation des modèles s'est basée selon les critères établis dans le cahier des charges. La pertinence des blocs à modéliser l'interaction laser-hydrogel a été évaluée en comparant le comportement des bulles de cavitation obtenues lors de l'usinage

des différents blocs d'hydrogels avec celles obtenues lors de l'usinage des microfibres. La biocompatibilité a été évaluée en fonction de l'aspect et de l'adhérence des cellules aux blocs quelques heures après l'ensemencement.

Tableau 2 : Bilan des quatre modèles développés. La présence d'une coche verte et d'une croix rouge indique respectivement lorsque le critère est respecté ou non par le modèle. Lorsque le modèle ne remplit que partiellement l'un des critères, un $\pm$ bleu est indiqué. La pertinence du modèle est évaluée vis-à-vis du comportement des bulles observées lors de l'usinage.

MODÈLES		Collagène à 5 mg/mL avec CEG	Collagène/gélatine à 40/60 % sans cellules	Collagène/gélatine à 20/80 % sans cellules	Gélatine à 2 % sans cellules
CRITÈRES					
Facilité de préparation		✗	$\pm$	$\pm$	✓
Rapidité		✓	$\pm$	$\pm$	✓
Coût/Accès de la matière première		✗	$\pm$	✓	✓
Transportabilité		✗	✓	✓	✓
Pertinence du modèle		✗ (Pas d'interaction volumique possible)	✗ (Trop liquide)	✗ (Trop liquide)	$\pm$ (Absence de collagène)
Transparence à l'IR		✗	✓	✓	✓
Biocompatibilité		✓	✗	✗	✗

I.2. Le modèle final et ses caractéristiques

I.2.1. Caractéristiques générales et dimensions

Le modèle choisi est donc un bloc de gélatine à 2 % dissous dans de l'eau distillée et coulé à l'intérieur de puits d'une plaque de 6 puits. La surface de chacun de ces blocs mesure 9,6 cm² et permet de réaliser de nombreux essais laser sur un même bloc. L'ajout de 3 mL par puits permet d'obtenir une hauteur de gel d'environ 3 mm, suffisante pour générer des motifs à une profondeur de 100 μ m.

I.2.2. Spectre d'absorption de l'hydrogel de gélatine

Le spectre d'absorption de l'hydrogel de gélatine a été mesuré à l'aide du spectrophotomètre UV-3600 Plus de Shimadzu en coulant l'hydrogel directement dans la cuve de mesure. Le spectre est mesuré après la gélification de la gélatine dans la cuve. Il est tracé avec le logiciel

Spectragryph 1.2.14 et représenté sur la Figure 21. A titre de comparaison, le spectre d'absorption de l'eau distillée a également été tracé dans les mêmes conditions.

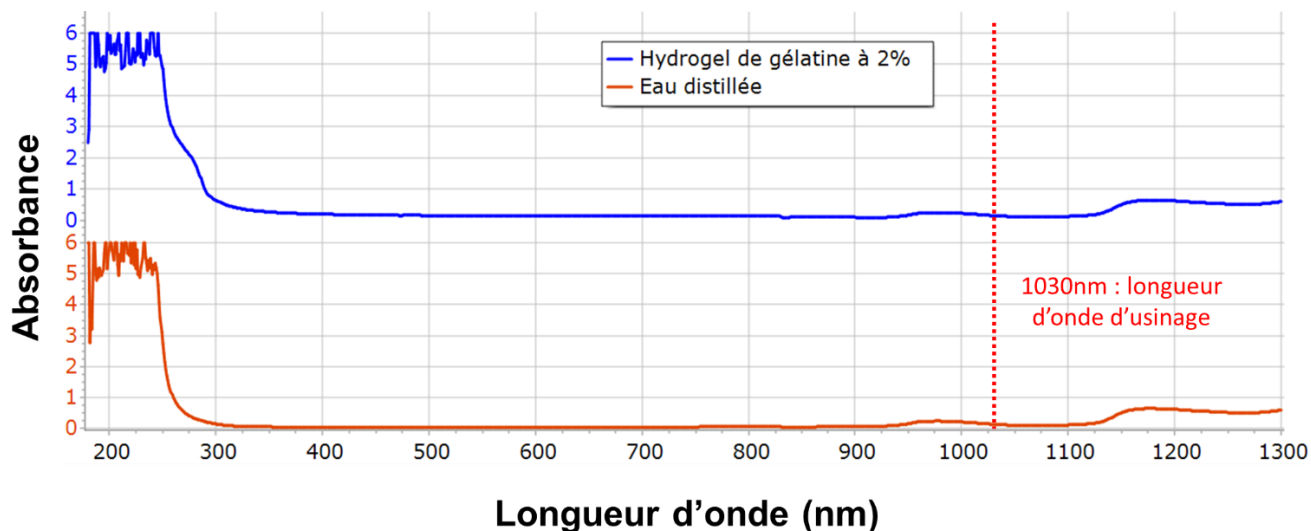


Figure 21 Spectre d'absorption de l'hydrogel de gélatine à 2 % (en bleu) et de son solvant, l'eau distillée (en orange) entre 180 et 1300 nm. La longueur d'onde d'usage utilisée pour l'ensemble des expériences de ce manuscrit est indiquée par des pointillés rouges (1030 nm).

Le pourcentage massique de gélatine étant de seulement 2 %, ses propriétés optiques sont similaires à celles de l'eau dans l'UV, le visible et le proche IR. Le matériau absorbe ainsi dans l'UV et est transparent dans le visible et le proche IR. A 1030 nm, longueur d'onde d'usage des blocs de gélatine, le matériau est presque totalement transparent.

1.2.3. Rhéologie de l'hydrogel de gélatine

Pour évaluer la réponse de l'hydrogel de gélatine à une contrainte extérieure, des mesures de viscosité dynamique¹ ont été réalisées avec l'aide du Dr. Lemagnen, laboratoire technologie pharmaceutique de Bordeaux.

Le profil rhéologique de l'hydrogel de gélatine a été réalisé à l'aide d'un rhéomètre DV3T Touch Screen (Brookfield Ametek). 0,5 cm³ de gélatine à 2 %, préparé selon le protocole du paragraphe 1.1.3.3., a été déposé à l'intérieur de la chambre de mesure du rhéomètre tempérée à 15 °C. La surface du gel était soumise à des contraintes de cisaillement appliquées à l'aide d'un mobile de mesure cône-plan (CP52) tournant. Les mesures de viscosité étaient effectuées selon un cycle d'hystérésis : les contraintes de cisaillement appliquées étaient modulées en augmentant la vitesse de rotation du mobile par palier de 5 tours par minute (rpm) toutes les 3 minutes entre 5 et 20 rpm puis en diminuant la vitesse du mobile de la même

¹ La viscosité dynamique correspond à la résistance d'un fluide à son écoulement. Elle est généralement exprimée en centipoise (cP) où 1 cP = 1 mPa.s

façon pour revenir à une valeur de vitesse de 5 rpm. La valeur de la viscosité était relevée avant chaque changement de vitesse.

Les résultats sont présentés sur la Figure 22.

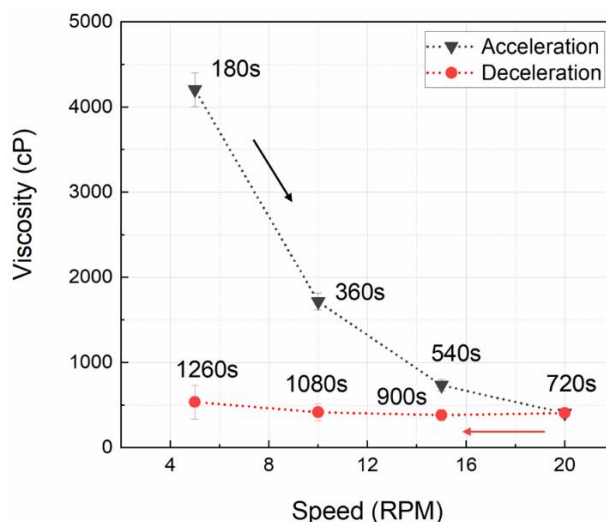


Figure 22 Evolution de la viscosité (en cP) de l'hydrogel de gélatine à 2 % selon un cycle d'hystérésis. Les contraintes de cisaillements sont augmentées en accélérant la rotation du mobile de mesure par palier de 5 rpm toutes les 3 minutes entre 5 et 20 rpm puis en ralentissant le mobile pour revenir à une vitesse de 5 rpm.

L'analyse rhéologique de la gélatine permet de comprendre les mécanismes de dégradation et de déformation de l'hydrogel sous l'action de contraintes extérieures. Le cycle d'hystérésis en Figure 22 représente l'évolution de la viscosité de la gélatine sous l'action de contraintes de cisaillement. Dès l'application d'une contrainte, la viscosité chute drastiquement (courbe d'accélération). Lors de ce cycle, la viscosité est augmentée par paliers. Ainsi, entre chaque point de mesure, la vitesse de rotation du mobile est constante. Les contraintes de cisaillement sont donc également constantes mais la viscosité de la gélatine continue de diminuer. Lorsque les contraintes de cisaillement diminuent (courbe de décélération), la viscosité de l'hydrogel ne retourne pas à sa valeur initiale. Ce comportement est caractéristique des fluides non Newtonien¹ aux propriétés thixotropiques² dont la viscosité dépend du temps d'application de la contrainte et des contraintes appliquées précédemment. On parle d'effet mémoire. Pour effacer la mémoire de déformation de la gélatine, la gélatine doit être progressivement chauffée et remuée pendant 20 minutes puis refroidie progressivement pour former un nouveau réseau réticulé.

¹ Un fluide non Newtonien est un fluide dont la viscosité dépend du taux de cisaillement. Lorsqu'un matériau est soumis à une contrainte de cisaillement, la réponse de ce fluide n'est donc pas proportionnelle.

² La thixotropie d'un liquide ou d'un gel se caractérise par une diminution de la viscosité lorsque le gradient de la vitesse de cisaillement augmente. On parle également de propriété rhéofluidifiante.

I.3. Déroulement de l'usinage des blocs d'hydrogel de gélatine

Les blocs de gélatine étaient préparés la veille de l'usinage à BioTis et déposés dans le réfrigérateur à 4 °C de la salle d'usinage d'ALPhANOV pendant la nuit.

Les blocs de gélatine étaient sortis au dernier moment du réfrigérateur, une fois tous les réglages de la station laser finis, puis déposés sur les platines de translation en XY. La gélatine étant transparente, l'interface air-gélatine était repérée à 5 µm près en tirant avec un faisceau laser de très faible intensité. Lorsque le point focal laser atteignait l'interface, la réflexion du faisceau devenait visible à la caméra. L'interface air-gélatine sert de position de référence selon z (axe vertical). La profondeur d'usinage est définie à partir de cette position de référence. Lorsque la profondeur est de 0 µm, le point focal est confondu avec la position de référence et lorsque la profondeur est de 100 µm, le point focal est situé 100 µm en dessous de l'interface.

Lors de l'usinage, des lignes droites étaient programmées en G-code puis exécutées à l'intérieur des blocs de gélatine. Le programme permettait de choisir la profondeur d'usinage réalisé à partir de la surface de référence, la vitesse de déplacement des platines en X et Y ainsi que le nombre de passages laser. Ce programme est présenté dans l'Annexe 1.

I.4. Caractérisation des blocs de gélatine usinés

L'hydrogel de gélatine étant homogène et transparent, un microscope optique en lumière blanche suffisait pour visualiser les plus grandes modifications induites par laser dans le volume des blocs de gélatine. Toutefois, afin d'observer les plus petits détails, la gélatine a été analysée avec un microscope à épifluorescence après ajout de fluorescéine. En effet, la fluorescéine est un colorant émettant une fluorescence jaune-verte [520-530 nm] lorsqu'il est exposé à une lumière bleue [465-490 nm]. Afin d'améliorer le contraste des images obtenues, 500 µL d'une solution de fluorescéine (diluée à 1/3000 dans de l'eau distillée) étaient déposés sur chaque bloc de gélatine juste après usinage laser. La solution imprégnait les blocs de gélatine pendant 24 heures à 4 °C puis étaient rincée à l'eau distillée. Les échantillons étaient ensuite analysés à l'aide d'un microscope à épifluorescence sous excitation d'une lumière bleue.

Les images obtenues par microscopie à épifluorescence ont ensuite été analysées avec le logiciel Image J. Les dimensions des canaux formés par laser et des zones modifiées thermiquement ou mécaniquement entourant les canaux ont été mesurées sur chacune des images avec le logiciel Image J à l'aide d'une macro détaillée dans l'Annexe 2.

II. Fabrication, caractérisation et usinage des microfibres

II.1. Fabrication de la fibre

II.1.1. Protocole de culture cellulaire

Deux types cellulaires ont été utilisés pour ce projet, des cellules endothéliales glomérulaires et des podocytes. Ils provenaient d'une collaboration avec le laboratoire de l'Academic Renal Unit de l'Université de Bristol (Southmead Hospital, Bristol, UK). Les deux lignées étaient issues de cellules rénales humaines puis immortalisées par transfection de l'antigène thermosensible SV40. Cette transfection leur permet de proliférer à 33 °C et de se différencier à 37 °C.

Les CEG sont cultivés dans le milieu de culture EGM2 (Lonza) dans un incubateur à 33 °C avec 5 % de CO₂ pour prolifération. Cette lignée cellulaire se différenciait après 5 jours passés dans un incubateur à 37 °C. Après 5 jours, les cellules exprimaient des marqueurs de différenciation spécifiques comme le récepteur au VEGF ou le facteur de von Willebrand [4, 67].

Les podocytes sont cultivés dans le milieu de culture RPMI 1640 + Glutamax 1 (Life Technologies) supplémenté avec :

- 10 % de sérum de veau fœtal (GE Healthcare)
- 1 % d'insuline transferrine sélénium (Gibco)
- 100 µg/mL de streptomycine
- 100 µg/mL de pénicilline (Life Technologies).

Les podocytes prolifèrent dans un incubateur à 33 °C et 5 % de CO₂ et se différencient après 14 jours passés dans un incubateur à 37 °C. Ils expriment alors des marqueurs spécifiques comme la néphrine, la podocine ou la synaptopodine [67, 110]. Les milieux de culture sont changés tous les 2 jours.

Pour la création d'une fibre ou amplification cellulaire, les cellules sont rincées avec 5 mL de PBS 1X (Gibco) puis recouvertes de 5 mL de trypsine (Gibco) pendant 4 minutes à 33 °C. Après avoir vérifié le détachement des cellules de la boîte de culture par microscopie optique, l'action de la trypsine est inhibée par l'ajout de 5 mL de milieu de culture. Après centrifugation à 1100 tours/minute pendant 4 minutes, le culot cellulaire est remis en suspension avec du milieu de culture puis utilisé pour la création d'une fibre ou remis en culture à 33 °C pour prolifération.

II.1.2. Protocole de fabrication des microfibres

La technique de fabrication des microfibres s'est basée sur les travaux développés au sein de notre unité INSERM depuis 2013 [67]. Cette technique repose sur plusieurs étapes et est illustré sur la Figure 23 :

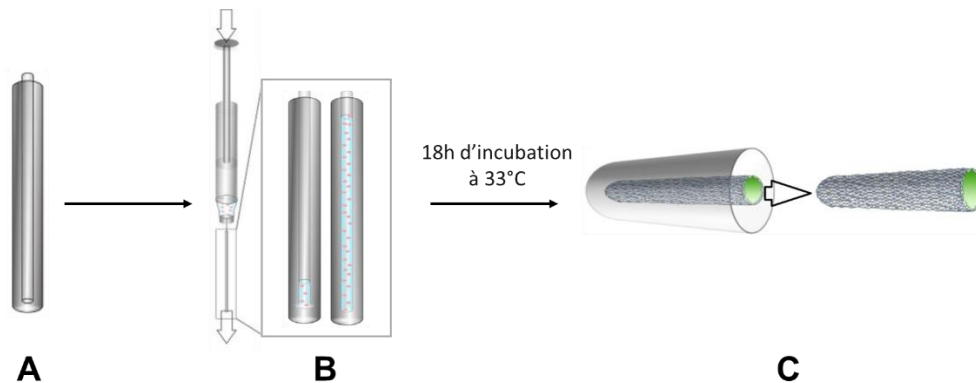


Figure 23 Procédé de fabrication d'une microfibre. A : Création d'une gaine d'alginate autour d'un capillaire de verre. B : Injection de la solution collagène/CEG en retirant simultanément le capillaire. C : Après 18h d'incubation et migration des CEG vers la périphérie retrait de la gaine d'alginate.

Tout d'abord, une gaine en alginate réticulée est formée autour d'un capillaire en polycarbonate (Paradigm Optics) de 350µm de diamètre (Figure 23 – A). Pour ce faire, le microcapillaire est plongé dans des bains successifs de chlorure de calcium (Sigma Aldrich) et d'alginate à 2 % (FMC BioPolymer) afin de réticuler l'alginate autour du capillaire par l'action du chlorure de calcium. Le capillaire de polycarbonate est ensuite retiré et une solution contenant du collagène de type I et des CEG est injectée simultanément à l'intérieur de la gaine (Figure 23 – B). L'injection est réalisée sur la glace pour maintenir le collagène liquide.

La solution cellulaire injectée est composée de :

- 35 millions de CEG/mL
- de collagène de type I (Corning Lab) à 5 mg/mL
- de soude à 1 mol/L (Sigma Aldrich)
- de PBS 10X pour 1/10^{ème} du volume total
- d'eau distillée.

Le collagène de type I est issu de tendons de queues de rat. Sa concentration et sa qualité varient en fonction du lot.

Après injection, la structure est incubée à 33 °C pour permettre la gélification de l'hydrogel de collagène à l'intérieur des gaines. Ces premières heures d'incubation sont marquées par la compaction des cellules endothéliales, c'est-à-dire la diminution du diamètre des microfibres. L'indice de compaction est calculé selon la formule suivante :

$$\text{indice de compaction} = \frac{\text{diamètre après 18 heures d'incubation}}{\text{diamètre juste après injection}}$$

Selon les travaux précédents, la durée d'incubation optimale est de 18 h et permet d'obtenir un indice de compaction idéal situé entre 0,7 et 0,9. Une incubation prolongée entraîne la perte de l'architecture fibrillaire de la fibre [67]. Au bout de 18 heures, les gaines sont donc retirées manuellement et les microfibres dénudées sont plongées dans du milieu de culture à 37 °C (Figure 23 – C). Les microfibres sont ensuite incubées pendant 5 jours à 37 °C. A la fin des 5 jours d'incubation, les CEG exprimaient leurs marqueurs de différenciation spécifiques.

Cette technique de fabrication de microfibres a ensuite été enrichie d'une dernière étape afin de reproduire la barrière de filtration glomérulaire *in vitro*. Après les 5 jours d'incubation, les podocytes sontensemencés en déposant quelques gouttes d'une solution à 50 000 cellules/mL le long des microfibres. La différenciation des podocytes est obtenue après 14 jours à 37 °C. On observe alors les premiers marqueurs témoins de la formation de la membrane basale glomérulaire.

Les microfibres sont ainsi matures et prêtes pour l'usinage laser après 14 jours suivant l'ensemencement des podocytes soit 20 jours après le début de leur fabrication.

II.2. Caractérisation des microfibres et du cœur de collagène

Lors d'un usinage laser, il est important de connaître les caractéristiques de l'échantillon et ses propriétés optiques afin d'optimiser les paramètres laser et de mieux contrôler les mécanismes de dégradation lors de l'interaction laser-matière.

II.2.1. Caractéristiques générales et dimensions

Les microfibres obtenues reproduisent l'organisation tridimensionnelle de capillaire glomérulaire. Elles ont une forme cylindrique de type cœur-écorce non perfusables. Le cœur est constitué d'hydrogel de collagène I de rat et l'écorce est constituée de 2 types cellulaires : des cellules endothéliales glomérulaires (CEG) et des podocytes. Les CEG s'agencent spontanément en périphérie du collagène pour former le versant interne de la couche cellulaire tandis que les podocytes recouvrent les cellules endothéliales pour former le versant externe.

L'image d'une fibre au microscope optique et le schéma de son organisation tridimensionnelle est visible sur la Figure 24.

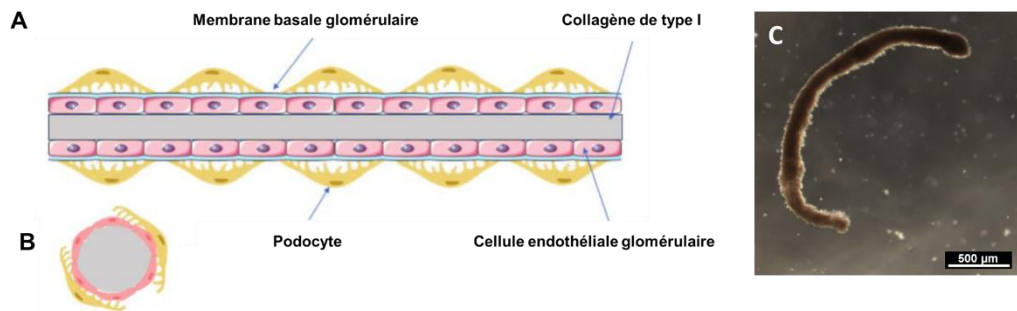


Figure 24 Structure cœur-écorce d'une microfibre glomérulaire. Le centre est composé d'un hydrogel de collagène de type I entouré de CEG puis de podocytes. La membrane basale glomérulaire est située à l'interface des deux types cellulaires. A : Coupe longitudinale. B : Coupe transversale. C : Photo d'une microfibre prise en microscopie optique classique [111].

Le diamètre externe moyen d'une microfibre est de 200 µm et leur longueur peut varier entre 0,5 mm et 3 cm.

Avec le temps, la longueur des fibres peut également diminuer et les fibres peuvent se replier sur elle-même. On parle de phénomène de contraction. L'indice de contraction au jour J peut se calculer selon la formule suivante :

$$\text{indice de contraction} = \frac{\text{longueur de la microfibre au jour } J}{\text{longueur de la microfibre à } J_0}$$

En condition normale, la longueur des fibres ne varie pas et l'indice de contraction vaut 1. Cependant, il arrive que l'interaction des cellules avec l'hydrogel conduisent à la contraction des microfibres. Lorsque la contraction est trop forte, les fibres acquièrent une forme sphérique et leurs caractéristiques diffèrent d'une fibre normale. L'interaction laser-matière change et leur usinage n'est plus pertinent pour notre application. Ce phénomène de contraction se produit majoritairement après l'ensemencement des podocytes et est influencée par l'interaction des cellules avec la matrice extracellulaire. Ce problème de contraction est également la cause du faible nombre d'échantillon disponible pour l'usinage laser.

II.2.2. Différenciation cellulaire et membrane de filtration glomérulaire

Par rapport aux modèles 2D, la structure tridimensionnelle de la fibre permet une viabilité prolongée des cellules et un maintien de leur phénotype. Des analyses par Western Blot (Figure 25) et par immunomarquage (Figure 26) ont montré l'expression des marqueurs de différenciation spécifiques aux deux types cellulaires au sein de la microfibre : l'expression des

facteurs de PECAM-1 et du VEGFR spécifiques aux CEG et l'expression de la synaptopodine, la néphrine et la podocine spécifiques aux podocytes [67].

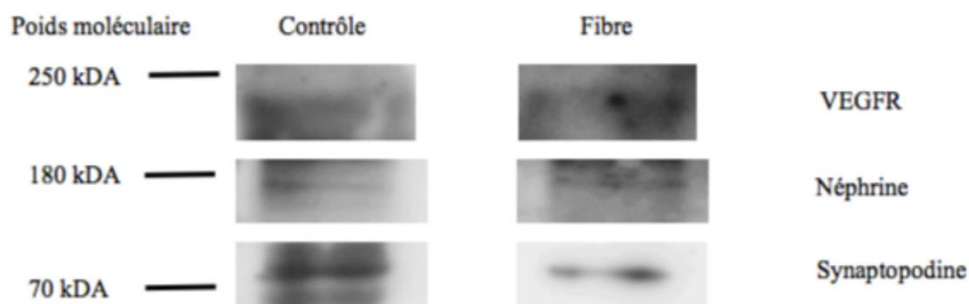


Figure 25 Mise en évidence par Western Blot des marqueurs de différenciation spécifique des cellules endothéliales (VEGFR) et ceux des podocytes (Néphrine et Synaptopodine) [67, 112].

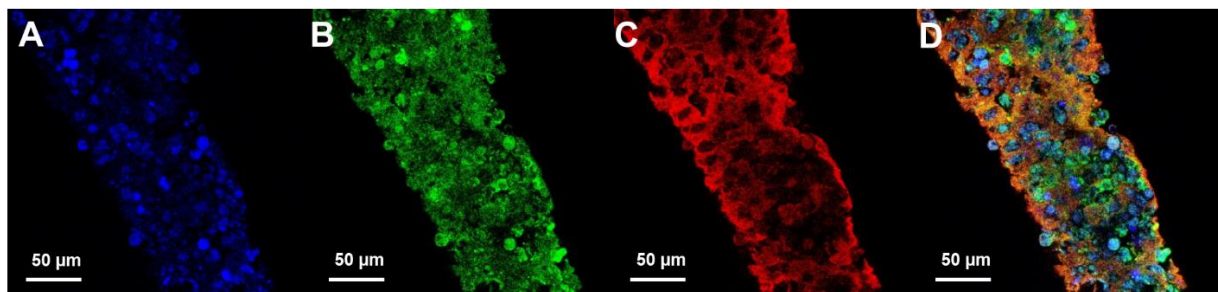


Figure 26 Microfibre prise au microscope confocal après immunomarquage. A) Marquage DAPI des noyaux cellulaires, B) Expression du marqueur PECAM-1 par les CEG, C) Expression de la podocine par les podocytes et D) Fusion des trois images. Chaque image correspond à l'empilement des valeurs maximales de chacune des coupes 2D [67, 113].

Après 21 jours de maturation, la formation d'une matrice extracellulaire à l'interface des CEG et des podocytes a été observée avec, en particulier, la néosynthèse du collagène de type IV, élément constitutif de la membrane basale glomérulaire et la présence de laminine et de nidogène mesurée par PCR (Figure 27).

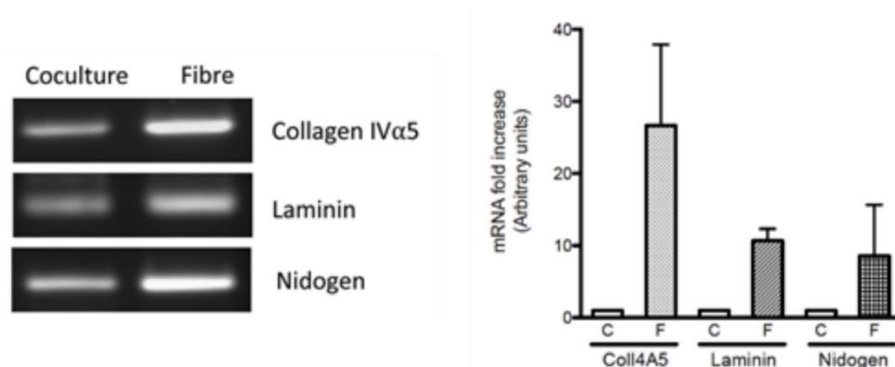


Figure 27 PCR et PCR quantitative du collagène IV- α 5, de la laminine et du nidogène dans un modèle de coculture et dans une microfibre. La néoformation de la membrane basale glomérulaire est possible dans le modèle 3D des fibres mais pas dans les modèles 2D de coculture [67, 112].

II.2.3. Viabilité cellulaire avant usinage

Avant chaque usinage laser, la viabilité des cellules des microfibres était contrôlée avec un test Live/Dead® comportant de l'éthidium homodimère et de la calcéine.

Le principe du marquage Live/Dead® est le suivant. Lorsqu'une cellule n'est plus viable, sa membrane devient perméable aux grandes molécules. **L'éthidium homodimère** peut alors franchir la membrane nucléaire et s'intercaler entre les molécules d'ADN de la cellule. Une fois intercalé, le marqueur fluorescent peut alors émettre de la lumière rouge (pic d'émission à 617 nm) lorsqu'il est excité par un laser de longueur d'onde 488 nm.

La calcéine est un substrat naturellement perméable à la membrane cytoplasmique et devient fluorescente après avoir été clivée par l'estérase des cellules, rendant ainsi le cytoplasme des cellules fluoresçant en vert (pic d'émission à 517 nm) sous l'action d'un laser à 488 nm. Si les cellules sont non viables, l'estérase est inhibée. La calcéine ne peut plus être clivée et n'émet aucun signal fluorescent.

Au cours du protocole Live/Dead®, les microfibres sont incubées pendant 30 minutes à 37 °C (5 % de CO₂) avec les réactifs d'un kit Live/Dead® de viabilité et de cytotoxicité (Life Technologies) dilués dans 2,5 mL de milieu de culture EGM2. Ce kit de viabilité contient des marqueurs fluorescents de calcéine (Ex/Em = 494/517 nm) et d'éthidium homodimère-1 rouge (Ex/Em = 517/617 nm). Après incubation, les microfibres sont rincées avec du milieu de culture avant d'être observées au microscope confocal. Un microscope confocal TCS SP2 (Leica) est ensuite utilisé pour observer le marquage Live/Dead® des microfibres. Pour éviter le recouvrement des deux signaux fluorescents, la calcéine est excitée avec une longueur d'onde de 488 nm et le signal d'émission est récupéré entre 515 et 590 nm tandis que l'éthidium

homodimère est excitée avec une longueur d'onde de 561 nm et son signal d'émission récupéré entre 600 et 680 nm.

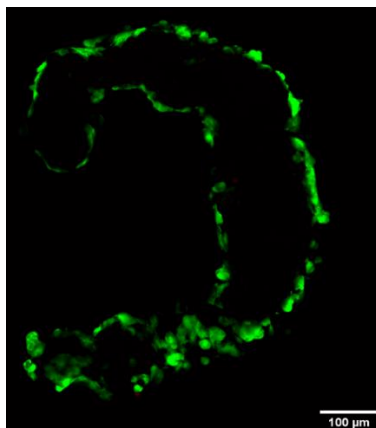


Figure 28 Coupe longitudinale d'une microfibre après marquage Live/Dead® révélé au microscope confocal. Le signal vert indique la présence de cellules viables entourant le cœur de collagène (non fluorescent). Aucune perte de viabilité n'est observée (absence de signal rouge).

La Figure 28 présente une microfibre avec un marquage Live/Dead® appliqué 24 heures avant l'usinage. Aucun signal rouge n'apparaît, signifiant qu'aucune perte de viabilité n'a été observée. Le marquage vert montre la présence de cellules viables formant un tapis confluent en périphérie de la microfibre. Aucun marquage n'est détecté au centre de la microfibre ce qui signifie que toutes les cellules ont migrées en périphérie de la fibre. Seul le collagène I, non marqué, occupe le cœur de la fibre.

II.2.4. Propriétés physiques du collagène

Le cœur des microfibres est constitué d'un hydrogel de collagène I à 5 mg/mL. Certaines des propriétés optiques de la solution d'hydrogel sont étudiées ci-dessous.

II.2.4.1. Spectre d'absorption de l'hydrogel de collagène

Le spectre d'absorption de l'hydrogel de collagène à une concentration de 5 mg/mL a été mesuré à l'aide du spectrophotomètre UV-3600 Plus de Shimadzu. Le spectre a ensuite été tracé avec le logiciel Spectragryph 1.2.14 et est représenté sur la Figure 29. A titre de

comparaison, le spectre d'absorption de l'eau distillée a également été tracé dans les mêmes conditions.

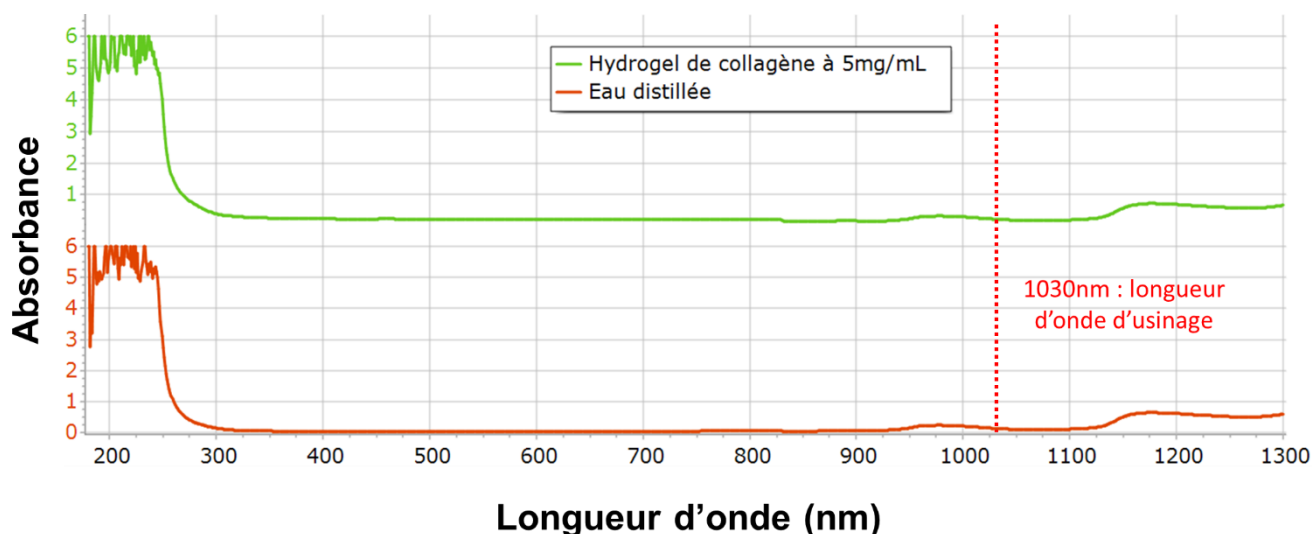


Figure 29 Spectre d'absorption de l'hydrogel de collagène à 5 mg/mL (en vert) et de son diluant, l'eau distillée (en rouge) entre 180 et 1300 nm. La longueur d'onde d'usinage utilisée pour l'ensemble des expériences est indiquée par des pointillés rouges (1030 nm).

En comparant le spectre de l'hydrogel de collagène avec celui de l'eau distillée, on remarque que les propriétés d'absorption de l'hydrogel ne sont pas affectées par l'ajout de collagène à 5mg/mL. Le matériau est ainsi absorbant dans l'UV et est transparent dans le visible et le proche IR. A 1030 nm, longueur d'onde d'usinage des microfibres de collagène, le matériau est presque totalement transparent.

II.2.4.2. Autofluorescence du collagène

Le collagène est autofluorescent. Il est donc capable d'émettre naturellement de la lumière sans marqueur fluorescent lorsqu'il est illuminé sous une certaine longueur d'onde. Cette propriété est intéressante pour notre application car elle permet de visualiser le cœur des microfibres sans ajouter de marqueur fluorescent au préalable. Selon le type de collagène et la composition de ses chaînes α , son pic d'excitation est situé entre 270 et 370 nm et son signal d'émission peut être récupéré entre 305 et 450 nm. Par exemple, le collagène de type I émet de la lumière avec un pic maximal situé à 364 nm lorsqu'il est illuminé dans l'ultraviolet avec un pic d'excitation à 269 nm. Ce pic d'autofluorescence est dû à la présence de résidus de tyrosine (environ 2 ‰ dans ses chaînes α) [114].

Les propriétés d'autofluorescence d'un composé peuvent évoluer lorsque ce dernier est mélangé avec d'autres substrats. Or, le cœur des microfibres est formé d'un hydrogel de collagène de type I, d'une grande quantité d'eau, ainsi que de PBS 1X et de soude. Pour évaluer les propriétés d'autofluorescence de cette solution, j'ai tracé les spectres des couples

Emission/Excitation au spectrofluorimètre. La solution d'hydrogel de collagène sans cellule a été préparée selon le protocole décrit au paragraphe II.1.2. puis diluée dans de l'eau distillée pour éviter la saturation de l'appareil à 1/1000, 6/1000 et 14/1000.

Le fonctionnement d'un spectrofluorimètre est le suivant. Une source de lumière polychromatique traverse un filtre ou un monochromateur pour ne conserver que la longueur d'onde d'intérêt. La lumière excitatrice traverse ensuite l'échantillon préalablement placé dans une cuve. Une partie de la source est alors absorbée par la solution puis réémise sous forme de fluorescence. La lumière réémise est collectée par un détecteur après traversée d'un filtre d'émission ou d'un second monochromateur. L'ensemble filtre-détecteur est généralement placé à 90° de la source initiale pour ne récupérer que le signal de fluorescence.

Afin d'obtenir le spectre d'Excitation/Emission de notre solution, la solution a été soumise à différentes longueurs d'ondes excitatrices afin de récupérer les spectres d'émission pour chacune des longueurs d'onde d'excitation. Parallèlement, le choix des longueurs d'ondes d'émission était affiné en traçant les spectres d'excitation à une longueur d'onde d'émission fixée et préalablement choisie en fonction des pics d'émission obtenus précédemment. Nous avons finalement obtenu deux spectres différents pour la solution de collagène, tracé à l'aide du logiciel SpectraGryph 1.2.14 et présenté sur la Figure 30 et la Figure 31 **Erreur ! Source du renvoi introuvable.**

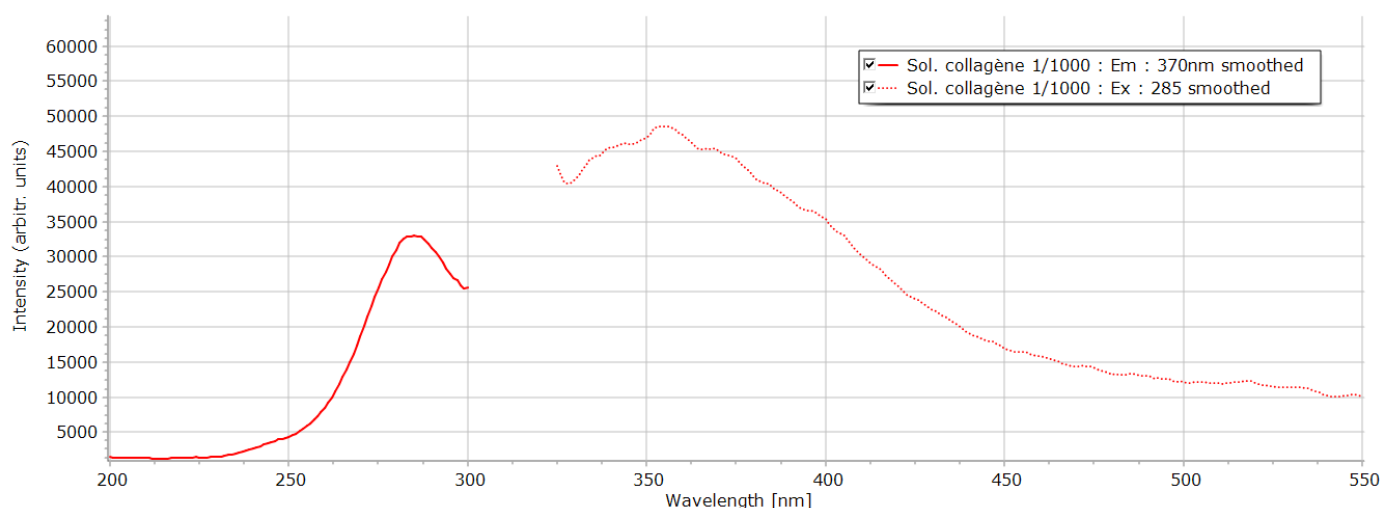


Figure 30 Spectres d'excitation (trait plein) et d'émission (pointillé) de la solution d'hydrogel de collagène diluée à 1/1000 entre 200 et 550 nm pour une émission fixée à 370 nm et une excitation fixée à 285 nm respectivement.

Le spectre de la Figure 30 présente un couple de spectres d'émission et d'excitation de la solution diluée à 1/1000 dans de l'eau distillée dont les pics respectifs sont situés à 285 nm et 370 nm. Ces pics correspondent à l'émission de lumière due à la présence de résidus de tyrosine dans les chaînes α du collagène I et soumise à une lumière de 285 nm. Le trou visible

entre les deux pics est une coupure volontaire de la mesure pour empêcher la diffusion de Rayleigh¹ d'aveugler le détecteur.

Le second spectre présenté en Figure 31 montre des pics d'intensité 10 fois plus importants que ceux de la Figure 30. Le spectre présente un premier pic d'émission à 397 nm pour une excitation fixée à 350 nm et un deuxième pic d'excitation obtenu à 377 nm pour une longueur d'onde d'émission fixée à 435 nm. Le spectre de l'eau distillée a été tracé dans les mêmes conditions puis superposé à celui de la solution. Les deux pics obtenus sont parfaitement corrélés à ceux de la solution de collagène. Ces deux pics sont donc attribués à l'eau et ne sont pas des pics d'autofluorescence. Il s'agit de pics parasites dus à la diffusion Raman² du solvant.

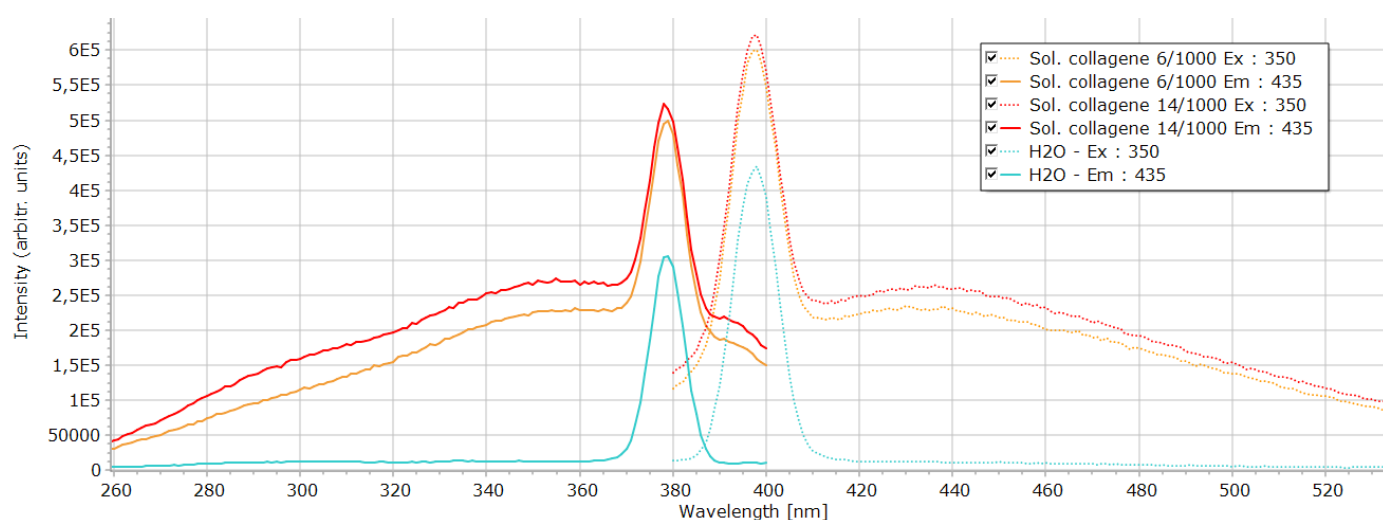


Figure 31 Couple des spectres d'excitation (trait plein) et d'émission (pointillé) de la solution d'hydrogel de collagène diluée à 6/1000 et 14/1000 respectivement en orange et en rouge entre 260 et 530 nm pour une émission fixée à 435 nm et une excitation fixée à 350 nm respectivement. Le couple excitation/émission de l'eau est également tracé en bleu à titre de comparaison.

Exemples des bandes Raman pour l'eau dans l'ultraviolet :

- Excitation à 313 nm – Emission à 350 nm
- Excitation à 350 nm – Emission à 397 nm
- Excitation à 366 nm – Emission à 418 nm

L'autofluorescence du collagène peut être utilisée pour détecter le collagène à l'aide d'un microscope à épifluorescence ou d'un microscope confocal sans utiliser de marqueur fluorescent exogène. Cependant il s'agit d'un phénomène peu intense et susceptible d'être

¹ La diffusion de Rayleigh est un phénomène de diffusion élastique sans variation d'énergie. Elle se fait à la même longueur d'onde que la lumière incidente et donne naissance à un pic de très forte intensité.

² La diffusion Raman est un phénomène de diffusion inélastique d'un photon avec perte d'énergie, une partie de l'énergie du faisceau incident étant absorbée par la molécule. Cette diffusion modifie la longueur d'onde de la lumière diffusée généralement vers des longueurs d'ondes plus importantes.

masqué par des phénomènes parasites ou des signaux fluorescents provenant de marqueurs cellulaires.

II.3. Usinage des microfibres

II.3.1. Support échantillon

II.3.1.1. Cahier des charges du support échantillon

Lors de l'usinage, les microfibres étaient initialement déposées sur une lame de verre sans milieu de culture pour éviter au faisceau laser de traverser une couche de liquide avant d'atteindre l'échantillon. Cependant, sans milieu de culture, les microfibres vivantes se dessèchent et ne survivent pas.

Afin de préserver la viabilité cellulaire pendant l'usinage, j'ai travaillé sur la mise au point d'un support échantillon. Ce support devait permettre de :

- maintenir des conditions viables pour les cellules : hydratation, apport en nutriments et antibiotiques, température et minimiser les risques de contaminations,
- maintenir les microfibres immobiles lors de l'usinage laser,
- empêcher la dispersion du faisceau laser lors de la traversée de l'échantillon.

II.3.1.2. Tests de différents supports échantillon

Support n°1 : Lame de verre

Une microfibre a été déposée sur une lame de verre avec une ou deux gouttes de milieu de culture. Puis, un trait laser a été réalisé en visant le cœur de collagène de la fibre. Pendant ces essais, la fibre a fortement adhéré à la lame et ne bougeait pas pendant l'usinage. En revanche, elle s'aplatissait et se desséchait très rapidement devenant difficile à décoller de la

lame après usinage. De plus, les impulsions laser usinaient directement la paroi cellulaire, en raison de sa trop fine épaisseur (Figure 32).

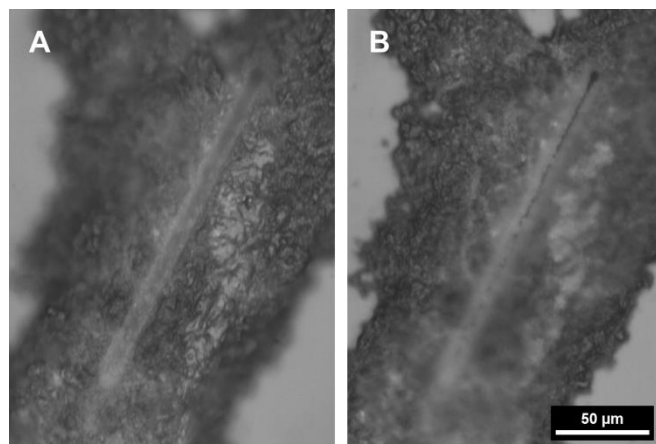


Figure 32 Usinage d'une microfibre placée sur une lame de verre. Le tir laser focalisé au centre de la fibre (A) a percé la paroi cellulaire (B).

Support n°2 : Création d'une ambiance humide

Les fibres étant sensibles à l'hydratation, j'ai ensuite essayé de créer une ambiance humide autour des capillaires. Pour ce faire, je les ai déposées à l'intérieur d'une boîte de Petri avec quelques gouttes de milieu de culture puis j'ai disposé tout autour des cotons chirurgicaux imbibés de PBS 1X ou de milieu de culture.

Cette méthode n'a pas été concluante : soit la quantité de liquide ajoutée n'était pas suffisante pour saturer les cotons et la fibre n'était pas assez hydratée ; soit la quantité était suffisante pour saturer les cotons chirurgicaux et inonder la boîte de Petri. La fibre n'était alors plus immobilisée et flottait dans la boîte. Dès le premier impact, elle était propulsée vers les cotons chirurgicaux et disparaissait. En revanche, les conditions d'hydratation étaient idéales et permettaient la formation de bulles de cavitation dans le cœur de collagène (Figure 33).

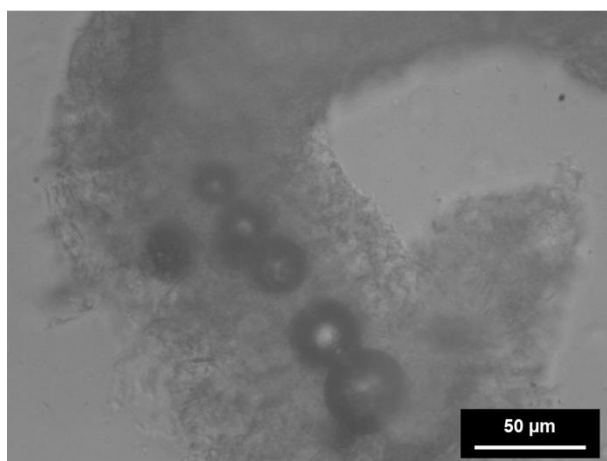


Figure 33 Formation de bulles de cavitation après usinage laser à l'intérieur d'une fibre hydratée dans une boîte de Petri inondée de PBS 1X. Photo prise sur l'une des rares fibres retrouvées lors de ces essais.

L'utilisation d'un spray diffusant, appliqué régulièrement sur les microfibrilles a également été essayé. La qualité d'hydratation des fibres s'est légèrement améliorée mais la présence de nombreuses gouttelettes autour de la fibre a totalement dispersé l'énergie du faisceau laser lors de l'usinage.

Support n°3 : Le Parafilm®

J'ai également essayé de déposer les microfibrilles sur une surface hydrophobe comme du Parafilm® avec quelques gouttes de milieu de culture pour empêcher l'eau contenue dans la fibre de s'écouler. L'utilisation du Parafilm® a complètement desséchée la microfibre (Figure 34).

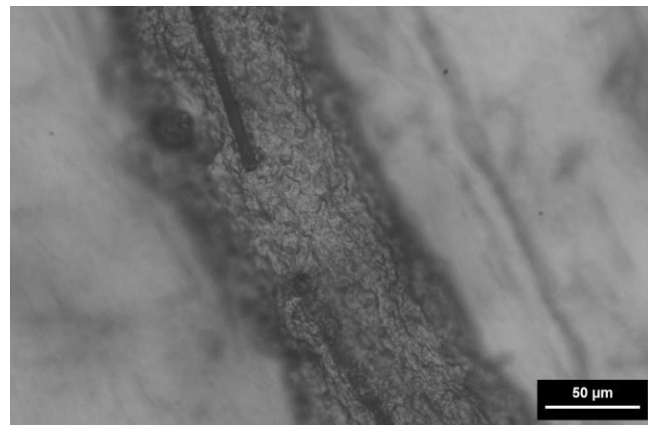


Figure 34 Gravure laser sur la surface cellulaire d'une microfibre déposée sur Parafilm®.

Support n°4 : Impression 3D d'un support en acide polylactique (PLA)

L'idée suivante a été de fabriquer un support échantillon sur mesure en PLA par impression 3D (Sigma 3D printer, BNC3D). Le schéma du support imprimé est présenté sur la Figure 35. Le support comportait un sillon central recouvert d'une lamelle de verre laissant passer le faisceau laser et un corps ouvragé comme une passoire pour permettre au milieu de culture d'imbiber la fibre tout en l'immobilisant pendant l'usinage.

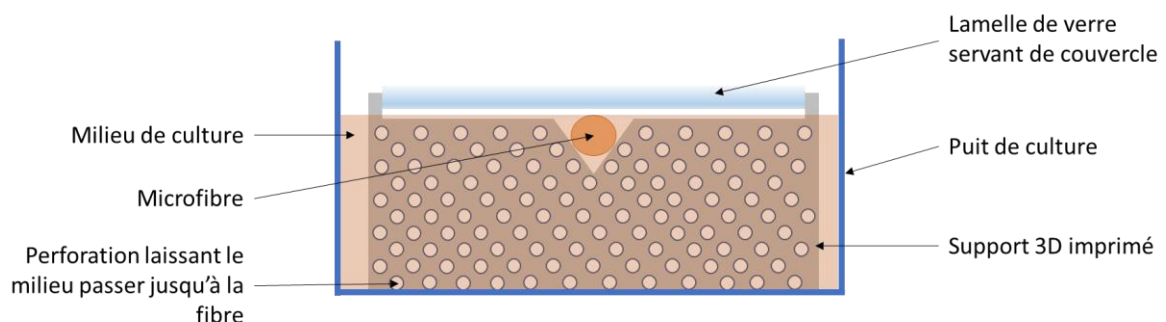


Figure 35 Support échantillon imprimé en PLA contenant un sillon central pour maintenir la fibre, une lamelle de verre en guise de couvercle et un corps ouvragé pour laisser passer le milieu de culture.

Cependant, deux problèmes se sont posés lors de sa conception et lors de son utilisation. Les perforations réalisées par impression 3D devaient être suffisamment petites pour empêcher la fibre de passer au travers. Or, l'utilisation de fils de PLA de 400 µm de diamètre ne permettait pas de réaliser des trous inférieurs à 0,5 mm. Enfin, en raison de l'aspect irrégulier dû à la juxtaposition des fils de 400 µm de diamètre, la fibre se coinçait dans les irrégularités. Par ailleurs, les cellules adhéraient fortement au support en PLA ce qui endommageait les microfibres.

Support n°5 : Plaque d'inox perforée

Des carrés de 2 cm par 2 cm ont été découpés dans un inox perforé puis poli et désinfectés dans un bain d'alcool pendant 24 heures. Juste avant l'usinage, la plaque d'inox était placée dans une boîte de Petri et saturée en milieu de culture. La fibre était posée sur la plaque d'inox. Les perforations de la plaque d'inox favorisaient l'adhésion de la fibre au support tout en la maintenant hydratée grâce à la formation d'un dôme de milieu de culture se formant à la surface de la plaque d'inox (Figure 36).

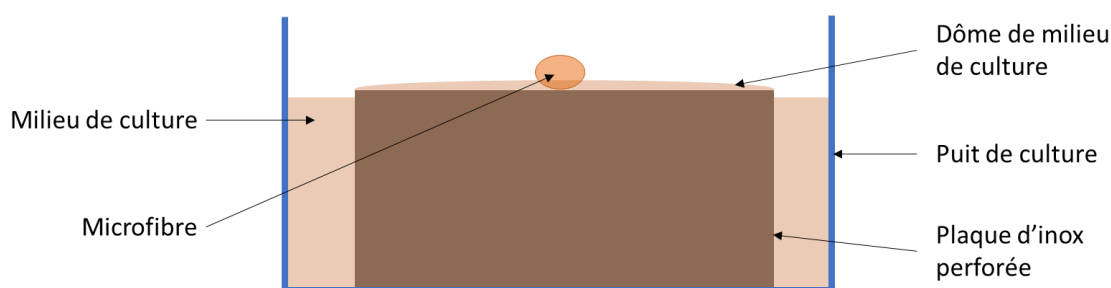


Figure 36 Support échantillon constitué d'une plaque en inox contenant des microperforations et saturée en milieu de culture.

L'utilisation des plaques en inox perforées a permis d'usiner la microfibre en la maintenant immobilisée et suffisamment hydratée pour observer des bulles de cavitation dans le cœur de collagène.

Support n°6 : Boîte de culture avec fond d'agarose

Nous avons ensuite choisi de recouvrir le fond des puits de culture avec de l'agarose pour limiter l'adhérence des cellules aux supports. Les microfibres étaient déposées sur le fond d'agarose avec 2-3 gouttes de milieu de culture.

Le revêtement d'agarose avec une faible quantité de milieu a permis d'usiner la fibre en la maintenant suffisamment hydratée pendant l'usinage pour observer la formation de bulles de cavitation à l'intérieur, tout en limitant fortement ses mouvements pendant l'usinage.

Pour chacun des échantillons, seules quelques gouttes ou une très fine couche de milieu de culture étaient déposées sur les capillaires. Augmenter la quantité de milieu de culture permettait d'apporter un surplus d'hydratation pour les cellules. Cependant, une épaisseur de liquide plus importante augmentait la dispersion du faisceau laser à travers le milieu et l'échantillon. Dans ces conditions, le faisceau laser n'atteignait jamais le cœur de collagène.

II.3.1.3. Support échantillon final

Sur les 6 supports échantillons testés seuls la plaque en inox perforée (support n°5) et la boîte de Petri recouverte d'un fond d'agarose (support n°6) permettait d'obtenir un phénomène de cavitation à l'intérieur de microfibres immobilisées. Pour vérifier que ces supports permettaient de préserver la viabilité des cellules, les microfibres vivantes ont été déposées sur ces deux supports pendant 20 minutes sans les usiner. Au bout de 20 minutes un marquage Live/Dead® est réalisé sur les microfibres en suivant le protocole détaillé au paragraphe II.2.3. La Figure 37 présente 2 fibres posées respectivement sur les supports n°5 saturé en EGM2 et n°6 avec quelques gouttes d'EGM2 pendant 20 minutes dans une salle à 21 °C.

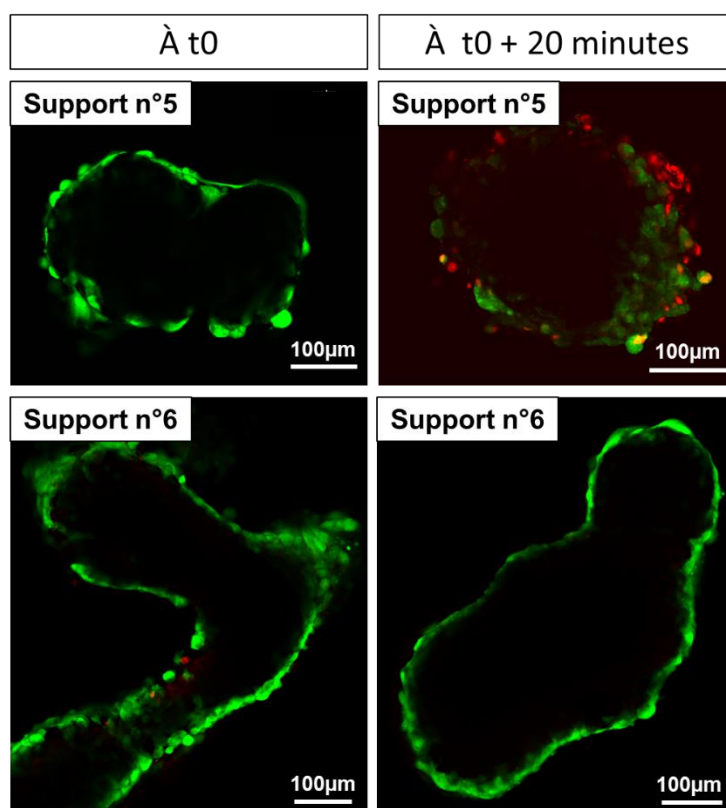


Figure 37 Viabilité cellulaire de deux microfibres posées sur un support en inox perforé et saturé en milieu de culture (en haut) et une boîte de Petri recouverte d'un fond d'agarose avec quelques gouttes de milieu (en bas). La viabilité cellulaire est évaluée à t0 juste avant de déposer la fibre sur le support et après 20 minutes passées sur le support dans une salle à 21 °C.

Après 20 minutes passées sur le support n°5, on peut observer une perte de viabilité cellulaire d'environ 50 % en moyenne sur l'ensemble des échantillons. Cette perte est probablement due à une souffrance cellulaire et un début d'apoptose.

Une amélioration de la viabilité cellulaire est observée avec le support n°6. Sur l'ensemble des échantillons, 85 % des fibres n'affichaient aucun signe d'apoptose au bout de 20 minutes tandis que les 25 % restantes affichaient un profil similaire à celle du support n°5.

Lors de la journée d'usinage, les fibres étaient manipulées dans des conditions non stériles et conservées dans 2 mL de milieu de culture à une température de 21 °C. Pour mesurer l'impact de l'absence de stérilité et de la baisse de température sur la viabilité cellulaire, j'ai mesuré la perte de viabilité cellulaire sur des fibres non usinées maintenues à 21 °C en conditions non stériles. Les fibres continuaient cependant d'être baignées dans du milieu de culture. Comme précédemment, un marquage Live/Dead® a été appliqué avant et après les 6 heures pour évaluer la perte de viabilité cellulaire.

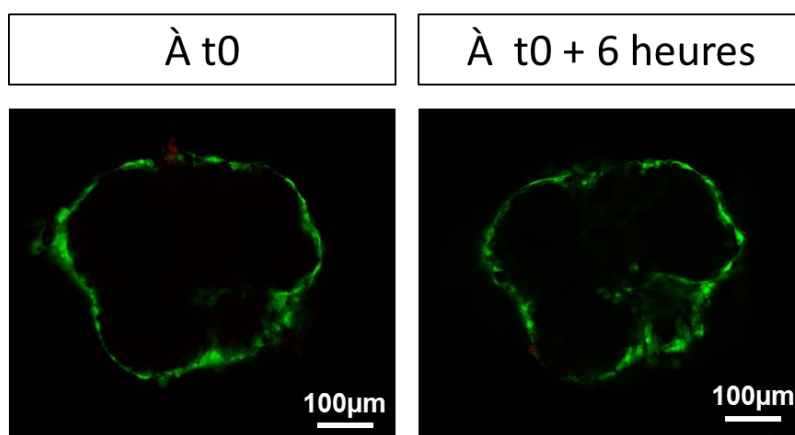


Figure 38 Test de viabilité cellulaire d'une microfibre plongée dans 3mL d'EGM2 à air libre dans une salle non stérile à 21°C pendant 6 heures. La viabilité cellulaire est évaluée à t0 avant de sortir la fibre de l'incubateur est après 6 heures passées à 21°C dans une salle non stérile.

Les essais montrent aucune perte de viabilité cellulaire pour les fibres maintenues à 21 °C, non stérile (Figure 38). Ainsi, la perte de viabilité observée pendant l'usinage laser est majoritairement due à la faible quantité de milieu apportée pendant les essais.

Le Tableau 3 ci-dessous résume les avantages et inconvénients des différents supports échantillons testés. Le maintien de la viabilité cellulaire après 20 minutes et la possibilité de réaliser l'usinage avec le support étaient les deux critères devant nécessairement être remplis par le support échantillon choisi.

Tableau 3 : Avantages et inconvénients des différents supports échantillons testés. Les deux dernières lignes du tableau, surligné en rouge, indiquent les critères rédhibitoires pour l'utilisation de ces supports. Une coche verte et une croix rouge sont respectivement indiquées lorsqu'une condition est remplie ou non par le support. Un point d'interrogation bleu est indiqué pour le support n°4 pour lequel aucune fibre n'a pu être usinée.

	Support 1	Support 2	Support 3	Support 4	Support 5	Support 6
Conserve l'hydratation	X	✓	X	?	✓	✓
Conserve la stérilité	X	X	X	X	X	X
Maintien de la température	X	X	X	X	X	X
Immobilisation des fibres	✓	X	✓	?	✓	✓
Fibres non aplaties	X	✓	X	?	✓	✓
Maintien de la viabilité cellulaire après 20 minutes	X	✓	X	X	X	✓
Possibilité d'usiner	✓	X	✓	X	✓	✓

Le choix du support échantillon s'est donc porté sur les boîtes de culture recouvertes d'une fine couche d'agarose gélifiée (quelques gouttes de milieu de culture étant déposées sur la fibre juste après son dépôt). Ces quelques gouttes permettaient d'apporter un minimum d'hydratation pendant 20 minutes. Au-delà de 20 minutes, la viabilité des microfibrilles posées sur ce support chutait de manière conséquente.

Echantillons contrôles : Chaque fibre usinée était accompagnée d'une seconde fibre contrôle non usinée. Pendant l'usinage, la fibre contrôle était déposée sur un support échantillon recouvert d'agarose avec quelques gouttes de milieu de culture. A la fin de l'usinage, les deux fibres retournaient simultanément dans leur eppendorf. La viabilité cellulaire des deux fibres était contrôlée la veille de la journée d'usinage et 24 heures après à l'aide d'un test Live/Dead®. Ainsi, les deux fibres recevaient un traitement identique à l'exception du tir laser. Ces fibres contrôles permettaient ainsi de contrôler l'origine de la mortalité cellulaire : impact laser ou manipulation de la fibre. Les fibres contrôles étaient sélectionnées parmi les fibres s'étant fortement contractées.

II.3.2. Déroulement de l'usinage

Préalablement à l'usinage, la puissance était réglée à l'aide de la lame demi-onde et d'un puissance-mètre (Ophir). La cadence laser était modifiée via le logiciel de contrôle du laser (Amplitude). La programmation du mouvement des platines et du déclenchement synchronisé du tir laser était rédigé en G-code.

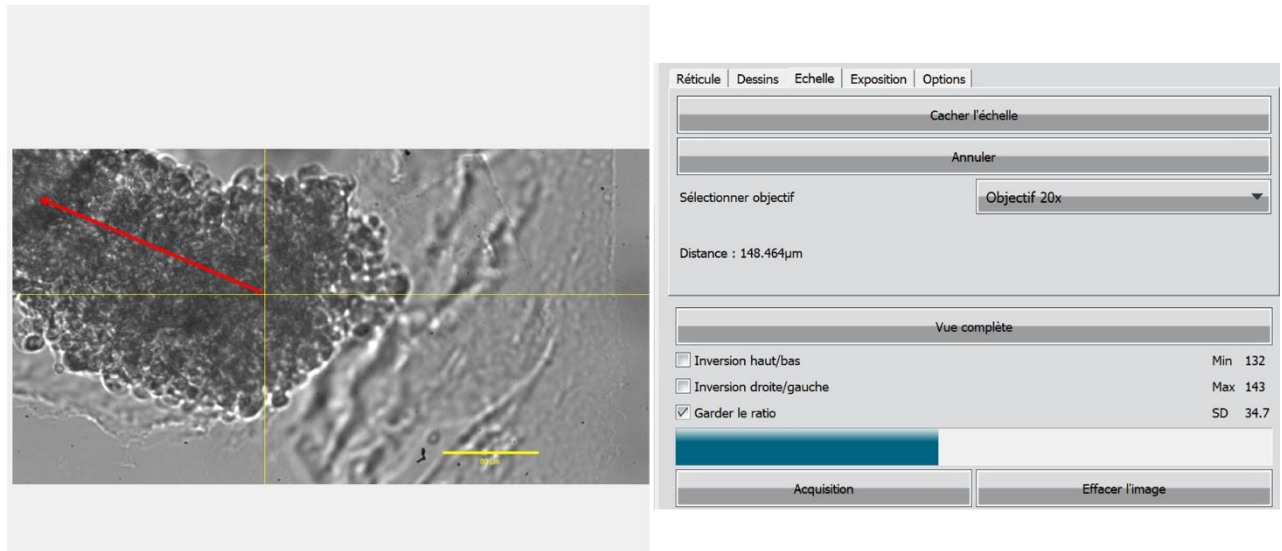


Figure 39 Capture d'écran du logiciel de la caméra CCD juste avant l'usinage. Le réticule (en jaune) est préalablement aligné avec le point focal laser puis il est ensuite positionné dans le cœur de la fibre au niveau du point de départ de la trajectoire à usiner. La flèche rouge représente la trajectoire du premier usinage dont les coordonnées de déplacement sont ensuite traduit en G-Code (voir Annexe 3).

Une fois la station d'usinage alignée et réglée, la microfibre à usiner était déposée sur le support échantillon avec quelques gouttes de milieu de culture puis déposée sur les platines de translation en XY (translation horizontale). En utilisant le logiciel de contrôle des platines (logiciel ALPhANOV), la fibre était centrée dans le champ de vision de la caméra, aligné avec le point focal laser. Un réticule (en jaune sur la Figure 39) permettait d'aligner le point d'impact laser avec le début de la zone de tir, au centre de la microfibre. La trajectoire du tir ainsi que la vitesse de déplacement des platines étaient programmés en G-code dans le logiciel de contrôle des platines en fonction de la géométrie de la microfibre puis exécutée. Les fibres n'étant pas souvent droites, plusieurs trajectoires rectilignes successives étaient programmées puis exécutées au fur et à mesure. Le programme en G-code est en Annexe 3.

Entre chaque trajectoire usinée, les photos de la microfibre et des bulles de cavitation formées étaient prises et analysées sous Image J.

Une fois l'usinage fini, la fibre était remise dans un bain de milieu de culture.

II.4. Caractérisation des microfibres usinées

II.4.1. Marquage Live/Dead®

Après chaque fin de journée d'usinage, les fibres usinées étaient ramenées au laboratoire BioTis dans des eppendorfs puis redéposées dans leur puit de culture rempli de 3mL de milieu de culture EGM2/RPMI dans l'incubateur à 37 °C. Un marquage Live/Dead® était effectué, 16 heures après, sur les fibres usinées et les fibres contrôles.

II.4.2. Imagerie au microscope confocal

Les microscopes confocaux permettent de réaliser des images d'échantillons épais avec une très faible profondeur de champ et une meilleure résolution que les techniques de microscopie classiques. Pour notre application, le confocal TCS SP2 (Leica) nous a permis d'imager la lumière créée par laser au centre de la microfibre, la viabilité des cellules et leur position par rapport au cœur de collagène. Le schéma de principe d'un confocal est présenté en Figure 40.

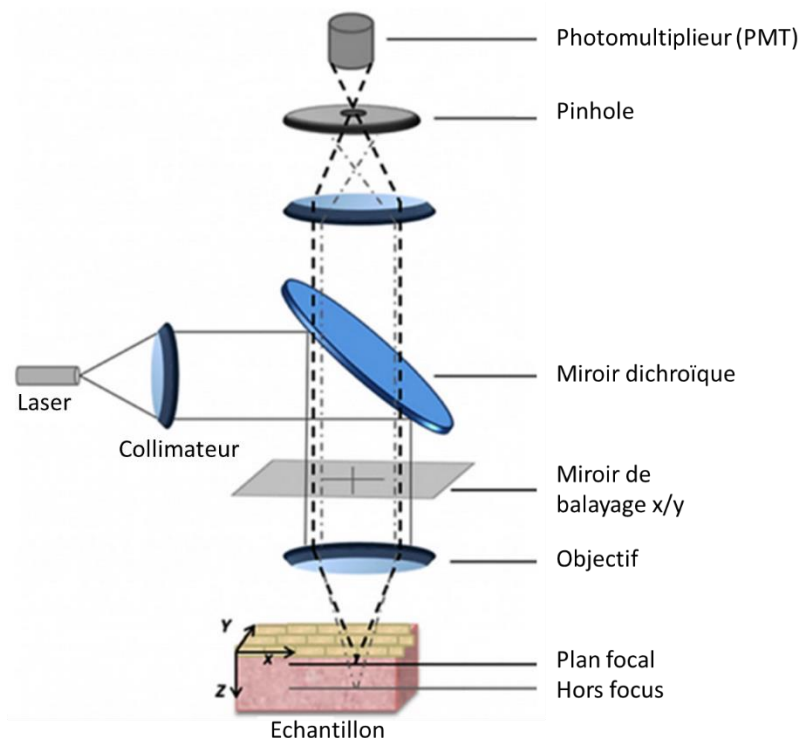


Figure 40 Schéma de principe du microscope confocal à balayage [115].

II.4.2.1. Visualisation des cellules

Les cellules ont été imagées au confocal après un marquage Live/Dead®. Les images étaient récupérées et analysées à l'aide du logiciel LAS-AF développé par Leica et du logiciel Image J.

A partir de ces images et en utilisant le logiciel Image J, le pourcentage de la surface occupée par le signal vert par rapport à la surface totale d'une microfibre et la densité de noyaux rouges par unité de surface ont été calculés. La macro est visible en Annexe 4.

II.4.2.2. Visualisation du collagène

Les fibres étant des objets denses et épais, les marqueurs fluorescents exogènes ne pénètrent pas à l'intérieur des échantillons. Pour détecter la lumière créée par laser au centre des fibres sans marqueur fluorescent, j'ai utilisé l'autofluorescence du collagène I (Ex/Em = 270-370 / 305-450 nm). L'autofluorescence du collagène permet d'obtenir un signal provenant du cœur des microfibres en augmentant l'intensité de l'excitation laser. A partir des images données par le microscope confocal, on peut modifier l'intensité et le contraste des pixels provenant du collagène à l'aide du logiciel Image J. Ce traitement informatique permet de révéler la présence ou non d'un canal sans utiliser de marqueur fluorescent.

II.4.3. Marquage DAPI

Préalablement au marquage DAPI, les microfibres usinées étaient fixées au paraformaldéhyde (PFA) selon le protocole suivant. Les microfibres usinées étaient préalablement rincées dans une solution de PBS 1X puis plongées dans 4 mL d'une solution de PFA à 4 % pendant 30 minutes à 4 °C. Les fibres étaient alors retirées du bain de PFA puis rincées trois fois avec une solution de PBS 1X. Après fixation, les microfibres étaient soit utilisées immédiatement soient placées dans une boîte de culture 12 puits contenant de l'eau distillée et scellées avec du Parafilm® pour conservation.

Après fixation, les noyaux cellulaires des microfibres usinées étaient marqués par un marquage DAPI (Di Aminido Phenylindole). Une solution de DAPI était préparée et diluée à 1/5000 dans une solution de PBS 1X. Cette solution était ensuite appliquée sur les fibres dans le noir à température ambiante, pendant 10 minutes. Les microfibres étaient ensuite rincées trois fois avec de l'eau distillée.

Les noyaux cellulaires des microfibres étaient ensuite observés au microscope confocal TCS SP2 (Leica) après excitation à 405 nm. Le signal émis était récupéré entre 410 et 480 nm.

III. Station d'usinage laser

La station d'usinage laser est un dispositif expérimental mis en place pendant ma thèse afin de réaliser une lumière à l'intérieur des microfibres et d'étudier l'interaction laser-hydrogel. Elle

est composée de 3 éléments : une source laser, une ligne optique (lame demi-onde + cube polariseur + agrandisseur de faisceau + miroirs) et un système de visualisation optique de l'échantillon (objectif + éclairage + caméra CCD). La Figure 41 et la Figure 42 présentent respectivement le schéma et la photographie de la station d'usinage laser composées de ses différents éléments.

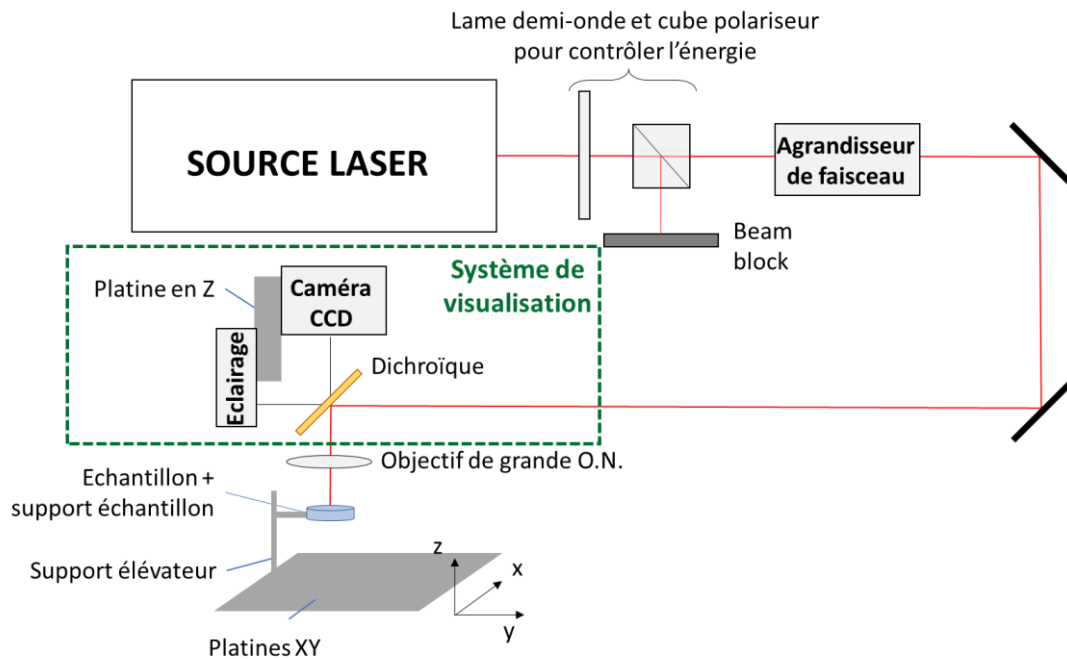


Figure 41 Schéma de la station d'usinage composée d'une source laser, d'une ligne optique et d'un jeu de platines XYZ supportant le système de visualisation des échantillons (objectif + caméra + éclairage).

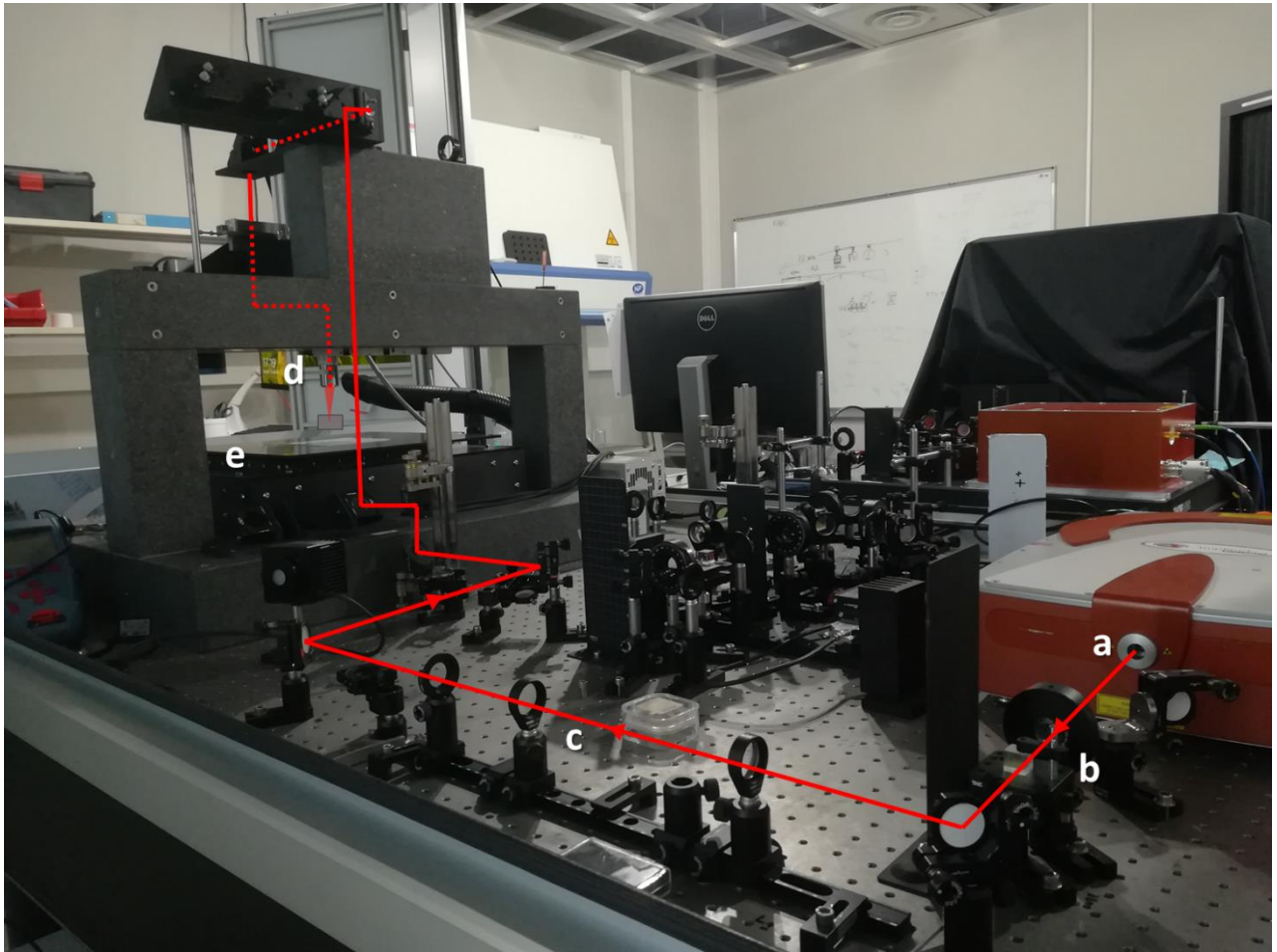


Figure 42 Photographie de la station d'usinage laser dans les locaux d'ALPhANOV. La trajectoire de la source laser jusqu'à l'échantillon est tracée en rouge. Les lettres en blanc représentent : a) la source laser, b) le couple lame demi-onde + polariseur, c) l'agrandisseur de faisceau, d) l'objectif de focalisation et e) les platines de translation horizontale sur lesquelles repose l'échantillon.

III.1. Choix de la source laser

Le succès d'un micro-usinage laser repose avant tout sur le choix d'une source laser adaptée. Certains paramètres sont inhérents à la source laser comme la longueur d'onde ou la durée d'impulsion. D'autres paramètres peuvent être modulés après sortie du faisceau laser en fonction des applications désirées comme par exemple l'énergie par impulsion ou le taux de recouvrement entre deux impulsions successives. Choisir une source laser unique pour une étude paramétrique revient à choisir certains paramètres fixés (longueur d'onde¹ et durée d'impulsion par exemple) et d'étudier l'influence d'autres paramètres plus facilement

¹ La longueur d'onde peut aussi être modulée en sortie laser à l'aide d'un module doubleur-tripleur qui permet de moduler la fréquence de l'onde laser afin de récupérer la seconde ou troisième harmonique pour obtenir une longueur d'onde divisée par 2 ou 3.

modulables. Le choix de la source laser doit donc tenir compte de l'influence des paramètres prédéterminés selon l'application voulue.

III.1.1. Choix de la durée d'impulsion

Un matériau transparent – comme les hydrogels de collagène et de gélatine – est un matériau qui laisse passer la lumière pour une longueur d'onde donnée et ne peut pas être usiné à l'aide d'un faisceau laser à cette longueur d'onde. Pour que l'usinage de ces matériaux soit possible, on peut utiliser des lasers à impulsions ultracourtes. L'utilisation de ces lasers dont la durée d'impulsion varie de quelques femtosecondes (10^{-15} s) à quelques picosecondes ($10 \cdot 10^{-12}$ s) permet de générer des effets non linéaires qui rendent ces matériaux localement absorbants en cumulant l'énergie de plusieurs photons de faible énergie. Comme nous l'avons vu au chapitre précédent, pour que ces photons soient absorbés simultanément et cumulent leur énergie, il faut déposer suffisamment de photons au même endroit et au même moment. Les lasers à impulsions ultracourtes permettent de concentrer les photons temporellement en déposant une grande quantité de photons durant la durée très courte d'une impulsion. Lorsque ces lasers sont combinés avec des optiques de focalisation à forte ouverture numérique – permettant de concentrer les photons spatialement dans un volume très petit – l'absorption simultanée des photons est alors possible. Les matériaux transparents deviennent localement absorbants et peuvent être usinés.

De plus, l'utilisation de lasers ultracourts permet de réduire le volume de matière chauffé autour du point focal laser lors de l'usinage. En effet, lors de l'interaction avec le laser, seulement quelques centaines de femtosecondes sont nécessaires pour que les électrons du volume focal soient chauffés. Or, le temps nécessaire aux électrons libres pour transmettre leur énergie au milieu environnant varie entre 1 et 100 picosecondes en fonction des matériaux. Ce temps est bien plus long que les quelques centaines de femtosecondes nécessaires aux électrons pour absorber l'énergie laser. Ainsi, le milieu environnant reste froid et on considère l'usinage par laser ultracourt comme interaction quasi athermique [116]. Cette propriété en fait des lasers de choix pour les applications biologiques, car la diffusion de température peut être très délétère pour les cellules. Zeigler *et al.* ont montré que 79 % des cellules restaient en vie 12 heures après rupture de leur membrane cytoplasmique avec un laser femtoseconde contre 36 % avec un laser nanoseconde [109].

Toutefois, la diffusion thermique ne peut être ignorée lorsque les lasers ultracourts sont utilisés avec des taux de répétition élevés où la superposition des impulsions crée alors de l'accumulation thermique.

III.1.2. Choix de la longueur d'onde

Lors de l'usinage dans le volume de matériaux transparents, la longueur d'onde laser choisie doit permettre de traverser le matériau en étant faiblement absorbée jusqu'à atteindre la profondeur d'usinage désirée

En biologie, il est connu que la lumière infrarouge pénètre plus profondément dans les tissus que les autres longueurs d'ondes. En effet, dans les tissus biologiques, l'absorption se fait majoritairement au niveau des chromophores endogènes, dont les principaux sont les protéines, l'hémoglobine, la mélanine et l'eau, et la graisse. Les spectres d'absorption des principaux chromophores sont présentés sur la Figure 43 et la Figure 44, à partir de données compilées par Jacques *et al.* [117].

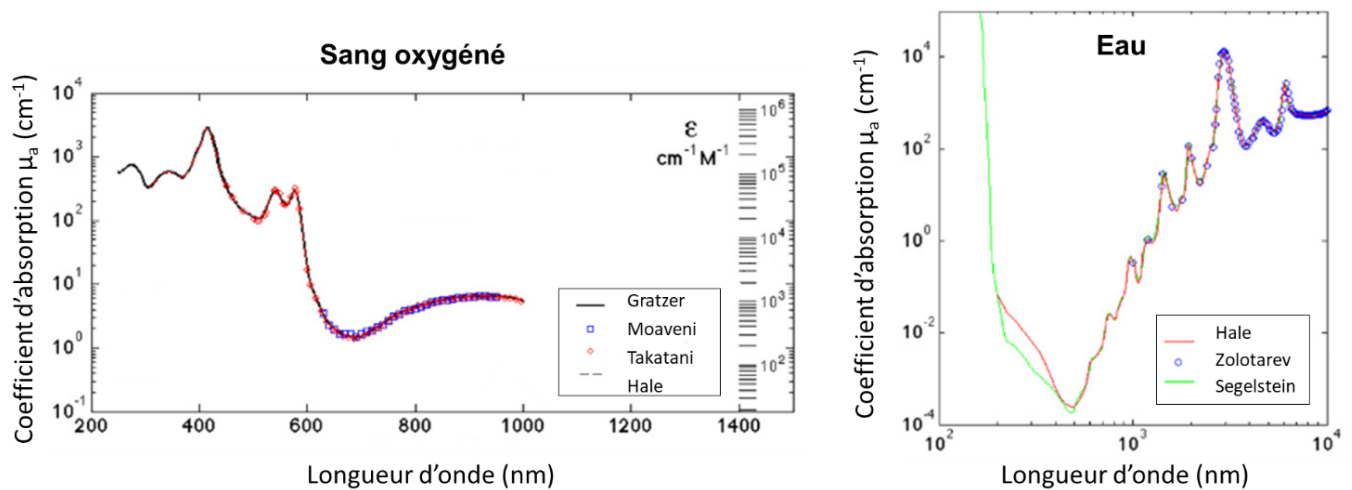


Figure 43 Spectres d'absorption du sang et de l'eau oxygénée en fonction de la longueur d'onde. Données compilées par Jacques (2013) [117]. Le nom des auteurs de chaque courbe est indiqué dans les encadrés.

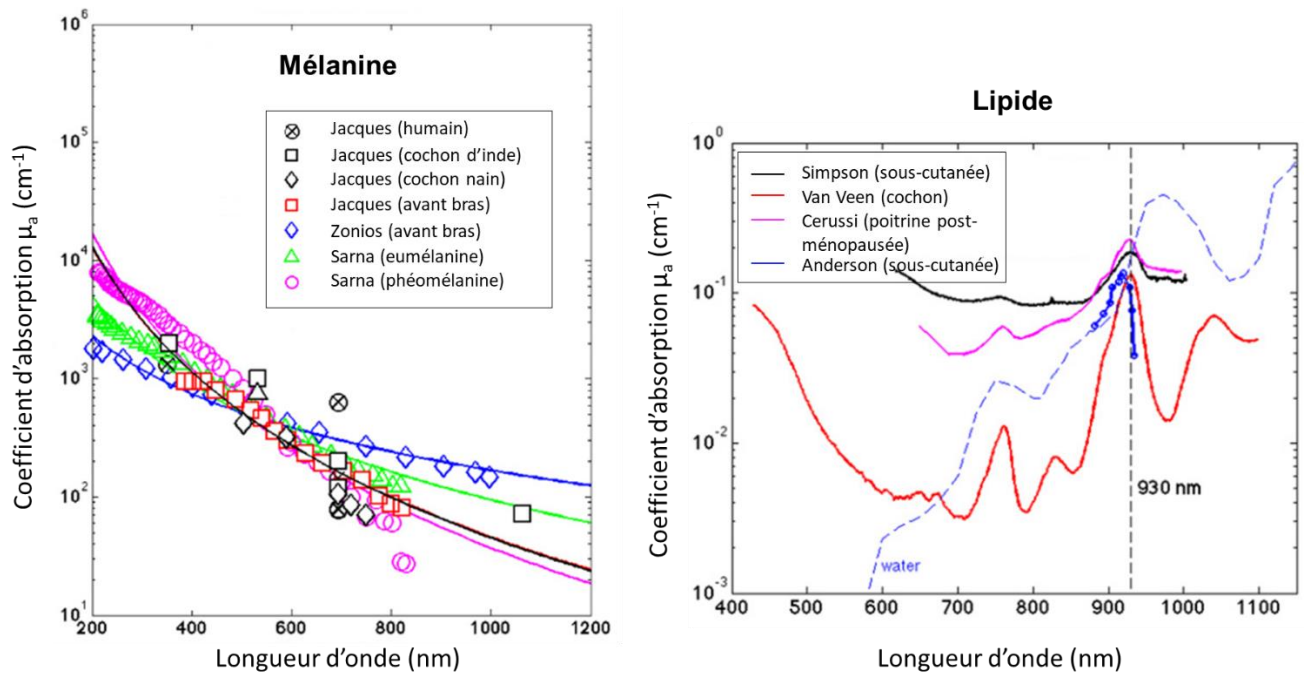


Figure 44 Spectres d'absorption de la mélanine et de la graisse en fonction de la longueur d'onde. Données compilées par Jacques (2013) [117].

L'absorption de la lumière dans la région infrarouge est essentiellement due à l'eau qui absorbe au-delà de 1300 nm tandis que les protéines comme le collagène ou la gélatine absorbent majoritairement dans l'ultraviolet. On parle ainsi d'une fenêtre biologique située entre 600 nm et 1200 nm, où les tissus sont peu absorbants et faiblement diffusants, ce qui permet d'atteindre des régions plus profondes dans les tissus biologiques sans affecter les couches superficielles. La différence de pénétration de la lumière dans les tissus en fonction de la longueur d'onde est illustrée sur la Figure 45.

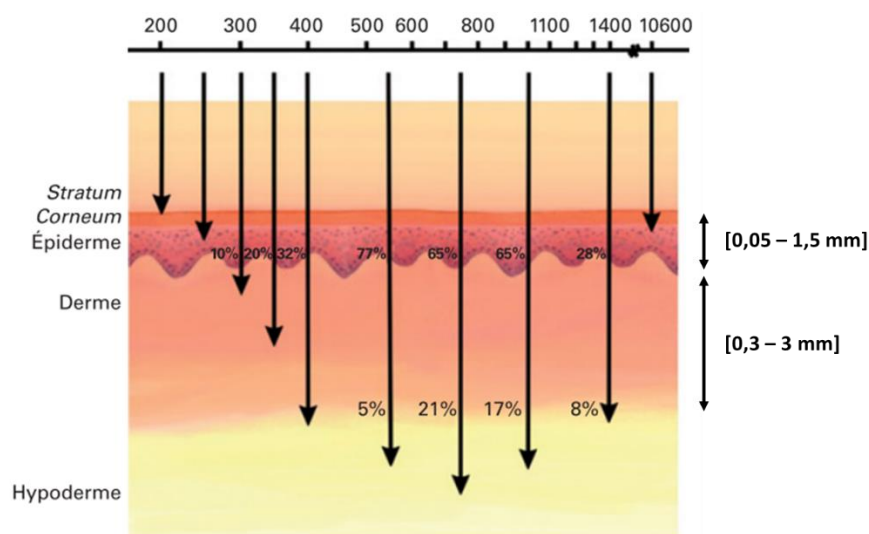


Figure 45 Exemple de la différence de pénétration de la lumière dans la peau en fonction de la longueur d'onde. Les longueurs d'ondes entre 600 et 1200 nm pénètrent les tissus plus profondément [69, 118].

L'étude des spectres d'absorption des matériaux transparents à usiner permet donc de déterminer les longueurs d'ondes pour lesquelles le matériau absorbera le plus le faisceau lumineux et celles pour lesquelles le matériau laissera passer la lumière.

Comme la majorité des protéines, le collagène et la gélatine sont principalement absorbants dans le domaine de l'ultraviolet avec des pics situés entre 200 et 300 nm. Cependant, les hydrogels issus de ces deux protéines sont enrichis en eau à plus de 95 %. Leurs propriétés d'absorption sont ainsi majoritairement influencées par la présence de l'eau qui est faiblement absorbante entre 300 et 1300 nm. Les spectres de ces deux hydrogels sont à retrouver au paragraphe I.2.2. et II.2.4.1.

Pour mon application, l'utilisation d'un faisceau infrarouge fortement focalisée permet donc de traverser la couche cellulaire avec une fluence inférieure au seuil de dommage cellulaire (Figure 46). Après traversée de la couche cellulaire, la forte focalisation du faisceau à impulsions ultracourtes génère une fluence suffisamment importante pour déclencher une absorption multiphotonique localisée au volume focal. Des canaux intravolumiques peuvent se former sans endommager la couche cellulaire.

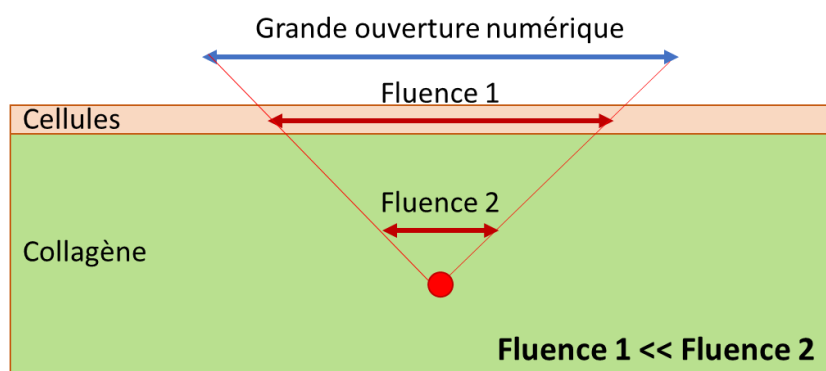


Figure 46 Une impulsion femtoseconde focalisée avec une grande optique numérique permet d'usiner le volume de d'hydrogel de collagène transparent au proche IR sans impacter la surface cellulaire.

Ainsi l'utilisation d'une longueur d'onde située dans le proche infrarouge favoriserait le passage du faisceau laser dans le matériau transparent sans endommager les couches superficielles.

III.1.3. Source laser utilisée

Mes travaux de thèse ont été réalisés avec le Satsuma HP³ (Amplitude). Il s'agit d'un laser fibré dont la longueur d'onde est centrée autour de 1030 nm (proche infrarouge) et qui délivre des impulsions laser de 350 femtosecondes. Sa puissance moyenne peut aller jusqu'à 40 W (40 μ J

par impulsion). La répartition de l'énergie du faisceau laser en sortie suit une gaussienne polarisé linéairement.

III.2. Présentation de la ligne optique

III.2.1. Description de la ligne optique

La ligne optique désigne l'ensemble des éléments optiques placé après la sortie laser. Elle sert à façonner le faisceau laser en fonction de l'application voulue. Après être sortie du laser, le faisceau traverse un couple polariseur/lame demi-onde. La lame d'onde permet de faire tourner le sens de la polarisation entrante. Lorsqu'elle est associée à un cube polariseur qui sépare le faisceau entrant en deux faisceaux de polarisation orthogonale, la lame demi-onde est utilisée pour régler finement l'énergie par impulsion (Figure 47).

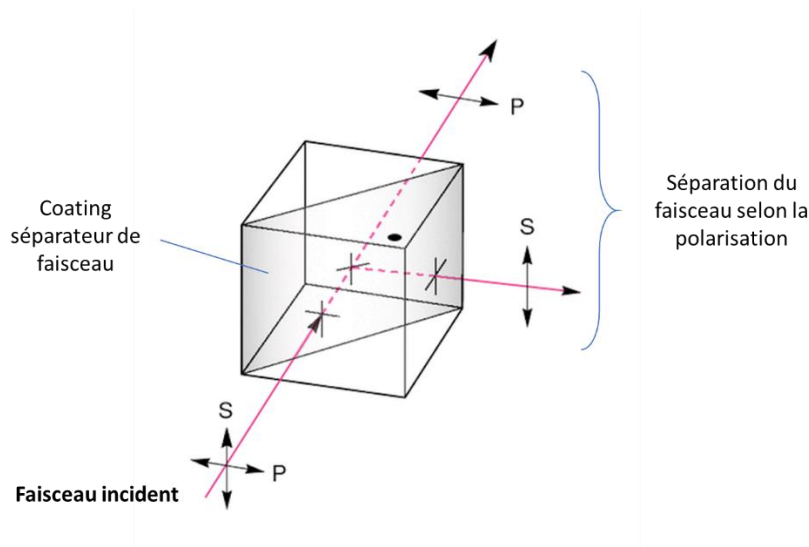


Figure 47 Schéma de principe d'un cube séparateur de faisceau. Un cube séparateur de faisceau est un miroir semi réfléchissant qui sépare le faisceau incident en un faisceau transmis (polarisation P) et un faisceau réfléchi (polarisation S) en fonction de la polarisation incidente.

Un agrandisseur de faisceau composé de deux lentilles élargit ensuite le faisceau lumineux d'un facteur 3. L'agrandissement du faisceau permet de recouvrir totalement la pupille d'entrée de l'objectif (de diamètre 8 mm) et d'obtenir après traversée de l'objectif un spot laser le plus petit possible au point de focalisation.

Le faisceau laser est ensuite dirigée à l'aide d'un jeu de miroirs vers un objectif 20X (Seiwa Optical) d'ouverture numérique $ON = 0,4$ qui focalise le faisceau sur l'échantillon avec un diamètre de focalisation théorique de $3,1 \mu\text{m}$. Ce diamètre de focalisation théorique ϕ_{foc} est

considéré comme correspondant à la limite théorique de diffraction donnée par le rayon de la tâche d'Airy, selon la formule suivante :

$$\phi_{foc} = 1,22 \times \frac{\lambda \times f}{D} = 1,22 \times \frac{\lambda}{ON}$$

avec $\lambda = 1030\text{nm}$, la longueur d'onde du faisceau laser et $ON = 0,4$, l'ouverture numérique de l'objectif.

Pendant l'usinage, les échantillons étaient placés sur des platines de translation horizontale en XY (ALIO XY Linear Motion System) contrôlées par ordinateur, tandis que l'objectif et le système de visualisation étaient vissés à des platines de translation selon l'axe vertical en z (ALIO Z Precision Crossed Roller Bearing Linear Stages). Ce jeu de platines contrôle le positionnement dans l'espace du point focal laser vis-à-vis des échantillons et permet de cibler précisément l'usinage dans le cœur des microfibres ou des blocs de gélatine (voir Figure 41). A partir du diamètre de spot ϕ_{foc} et de la vitesse de déplacement des platines, on peut calculer le taux de recouvrement entre deux impulsions laser successives, comme illustré sur la Figure 48.

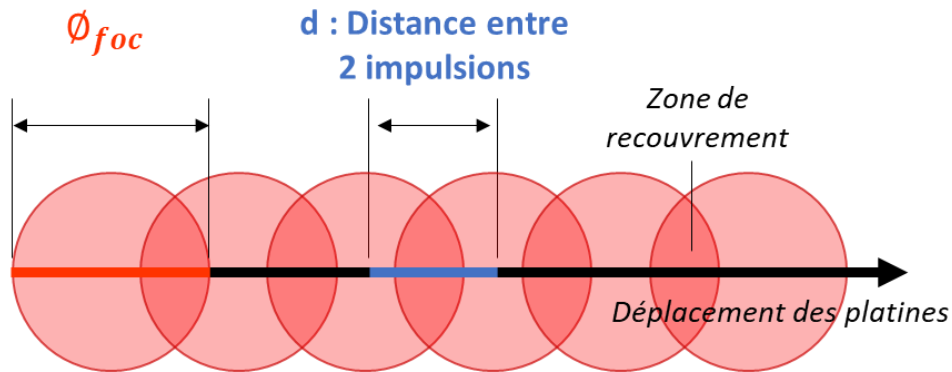


Figure 48 Schéma de principe illustrant le recouvrement entre deux impulsions successives. Durant l'usinage, seul les platines se déplacent tandis que le faisceau laser reste fixe. Sur le schéma, la première impulsion déposée est donc celle de droite et la dernière impulsion est celle le plus à gauche.

Le recouvrement OL (en %) est calculé à partir de la distance d séparant 2 impulsions successives, le diamètre de spot ϕ_{foc} au point de focalisation, la vitesse v de déplacement des platines et la cadence laser RR i.e. la fréquence impulsionnelle du laser selon la formule suivante :

$$OL = \left(\frac{\phi_{foc} - d}{\phi_{foc}} \right) \times 100 = \left(1 - \frac{v}{\phi_{foc} \times RR} \right) \times 100$$

III.2.2. Choix du système de focalisation

Lors de l'usinage laser, un objectif 20X (Seiwa Optical) d'ouverture numérique $ON = 0,4$ est utilisé. Le choix du grossissement et de l'ouverture numérique s'est effectué en prenant en compte les trois fonctions de l'objectif lors de l'usinage. L'objectif nous sert ici à :

- focaliser le faisceau lumineux pour obtenir un diamètre de focalisation très petit à l'aide d'une grande ouverture numérique et permettre l'usinage intravolumique de matériau transparent,
- visualiser l'échantillon et le faisceau laser avec un zoom 20X pour positionner le point de focalisation laser au centre des microfibres et cibler précisément le tir laser juste avant l'usinage,
- visualiser l'usinage laser en temps réel avec un zoom 20X pour observer le comportement du collagène et des bulles de cavitation formées.

III.3. Système d'imagerie en lumière blanche

Lors de l'interaction laser, des bulles de cavitation se forment dans le volume des échantillons. Les caractéristiques des bulles de cavitation (nombre, taille, vitesse d'expansion et de décroissance...) évoluent en fonction des paramètres laser utilisés. Pour étudier le comportement bullaire, un système de visualisation de l'échantillon a été installé sur la station d'usinage et est présenté sur la Figure 41.

Le système comporte une caméra CCD acA2000 (Basler) et un éclairage LED colinéaire au signal caméra dont les signaux traversent un objectif de grande ouverture numérique. Il permet d'envoyer le signal caméra, l'éclairage de lumière blanche et le faisceau laser sur un miroir dichroïque réfléchissant les longueurs d'onde IR et laissant passer les longueurs d'ondes du visible. Ce miroir dichroïque permet d'aligner le faisceau laser avec le signal caméra et la lampe LED et de les envoyer vers l'objectif de grande ouverture numérique servant à focaliser le faisceau pour l'usinage. La position de la caméra et de la lampe est uniquement réglable en z (axe vertical) car le miroir dichroïque est directement attaché à la platine de translation en z. Pendant l'usinage, le faisceau laser reste fixe tandis que l'échantillon, posé sur les platines de translation XY (translation horizontale), se déplace.

Cette configuration est utilisée pour calibrer le poste avant usinage et viser avec précision l'échantillon. En revanche, pendant la durée de l'usinage, (faisceau laser actif), la caméra ne peut pas être utilisée car elle est éblouie par l'intensité du faisceau laser. Une fois le laser arrêté, la caméra redevient utilisable et filme les bulles de cavitation formées. Cette configuration permet d'observer le résultat de l'interaction laser au centre des microfibres 5

secondes après l'usinage. Cependant, tous phénomènes se déroulant avant ces 5 secondes, ne sont pas observables dans cette configuration.

III.4. Mise au point d'un système d'imagerie du collagène en SHG

III.4.1. Pourquoi utiliser un second système d'imagerie ?

Lors de l'usinage, seules les bulles de cavitation sont observées mais pour savoir si un canal s'est formé, les échantillons doivent être ramenés au laboratoire de BioTis afin d'imager les microfibres au microscope confocal. Ce délai nous empêche de connaître directement le résultat de notre usinage et l'influence des paramètres utilisés sur la formation d'un canal intravolumique. De plus, l'imagerie confocale, servant à la révélation des canaux, est limitée à des échantillons d'épaisseurs maximales de 90 – 120 μm . Le diamètre moyen des microfibres étant supérieures à 200 μm , seule la moitié des fibres pouvait être analysée et des canaux formés pouvaient potentiellement ne pas être repérés.

Pour contourner ces limitations, j'ai reçu l'aide du Dr. Hage d'ALPhANOV qui a mis en place un microscope biphotonique permettant de visualiser le signal de génération de la seconde harmonique (SHG) du collagène immédiatement après l'usinage. Ce système d'imagerie a été implémenté directement sur la station d'usinage pour nous permettre d'imager les échantillons sur toute leur épaisseur, pendant et après l'usinage. L'utilisation de la microscopie SHG pourrait nous permettre de savoir comment évolue le collagène après l'usinage et si la formation d'un canal est détectable dès les premières minutes suivant l'usinage.

La collaboration avec le Dr. Hage, a ainsi permis de développer une nouvelle brique technologique au sein d'ALPhANOV, de démontrer la faisabilité d'usiner et d'imager le signal de SHG d'un échantillon sur la même station d'usinage et avec le même laser et de développer un système de contrôle de procédé appliqué au vivant.

III.4.2. Principe de la SHG

La microscopie de génération de seconde harmonique (SHG) est basée sur des interactions non linéaires à deux photons. Lorsque deux photons cohérents et de même énergie arrivent simultanément sur une molécule, la molécule libère immédiatement (10^{-16} s) l'énergie reçue des deux photons incidents sous la forme d'un seul photon sans échanger d'énergie avec l'environnement extérieur. L'énergie du photon émis vaut exactement le double de l'énergie

des photons incidents et la phase de l'onde émise est liée à celle de l'onde incidente (Figure 49) [119–121].

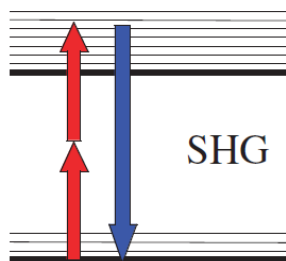


Figure 49 Diagramme de Jablonski illustrant le principe de SHG. Lorsqu'une molécule reçoit simultanément deux photons incidents cohérents et de même énergie, la molécule diffuse immédiatement l'énergie (10^{-16} s) sous la forme d'un seul photon d'énergie double sans échanger d'énergie avec le milieu environnant [120].

De même que pour une absorption multiphotonique, la microscopie SHG est possible sous l'action d'un laser à impulsions ultracourtes avec une longueur d'onde située dans le proche infrarouge et combinée avec un objectif de grande ouverture numérique. Elles possèdent des avantages majeurs par rapport à la microscopie de fluorescence :

- elle permet **d'imager les tissus jusqu'à une profondeur de 400 – 600 μm** . La longueur d'onde excitatrice est située dans le proche infrarouge (700 – 1200 nm) et appartient à la fenêtre biologique pour laquelle les tissus sont faiblement diffusants et faiblement absorbants. La lumière incidente pénètre donc plus profondément dans les tissus.
- elle **augmente drastiquement le rapport signal/bruit**. Lors de la microscopie de fluorescence à 1 photon, le signal est généré sur tout le trajet du faisceau excitateur et crée un bruit de fond qui masque le signal d'intérêt. Mais en SHG, le signal fluorescent provient uniquement du volume focal excité d'environ $1 \mu\text{m}^3$ en raison des interactions non linéaires. Le faisceau laser est ensuite balayé pour obtenir l'image point par point de tout l'échantillon.
- elle **préserve les tissus**. L'excitation laser étant restreinte au volume focal, chaque zone de l'échantillon n'est exposée que durant un bref instant. La viabilité des cellules est préservée et le risque de photoblanchiment des fluorophores est diminué.
- cette **technique est possible si l'échantillon possède une structure non centrosymétrique**. Lorsque plusieurs molécules sont soumises au faisceau incident, le signal détecté résulte de la superposition cohérente des ondes émises par les molécules excitées. Les amplitudes des ondes s'ajoutent plutôt que les intensités. En conséquence, le signal s'annule pour certains arrangements moléculaires et est accentué pour d'autres. La détection de SHG étant très spécifique, elle n'est possible que pour certains composants avec une grande organisation spatiale [119, 120].

Cette dernière propriété est très intéressante pour notre application. En effet, le collagène de type I, situé dans le cœur des microfibres, est un collagène fibrillaire. Il possède une structure en triple hélice organisée en fibrille avec une asymétrie électronique et une asymétrie de répartition dans l'espace ce qui permet l'émission d'un signal de SHG très intense. En revanche, le collagène IV, situé à l'interface des CEG et des podocytes, possède une structure en réseau non fibrillaire, qui ne permet pas de conserver la non centrosymétrie à l'échelle micrométrique. Il ne peut pas produire de SHG [121]. Ainsi, la visualisation du cœur de collagène de type I est possible par SHG sans être parasitée par l'émission d'un signal en provenance du collagène IV.

III.4.3. Dispositif expérimental

Afin de visualiser la SHG du collagène de type I juste après l'usinage, le microscope bi-photon a été installé sur une nouvelle ligne optique à partir de la même source laser (Figure 50). Comme pour la configuration d'usinage précédente, le faisceau laser traverse une lame demi-onde et un cube polariseur permettant de régler la puissance moyenne, puis un agrandisseur de faisceau de facteur 3. Le faisceau laser est ensuite envoyé vers la nouvelle ligne optique à l'aide du miroir flip-flap. Le microscope étant placé sur une table amovible un périscope et un jeu d'iris permettent ensuite d'aligner la source laser avec la configuration d'imagerie. Un second cube polariseur divise ensuite le faisceau en deux faisceaux sortants. Une lame demi-onde permet de répartir la puissance des deux faisceaux sortants. On obtient ainsi deux lignes optiques : une de forte puissance moyenne permettant d'usiner le collagène à l'intérieur des fibres et une de faible puissance moyenne permettant d'imager le signal de SHG. Les deux lignes optiques se rejoignent ensuite à l'aide d'un troisième cube polariseur vers le microscope SHG possédant un objectif de forte ouverture numérique dans lequel sera réalisé l'usinage des fibres et l'imagerie. L'utilisation alternée des deux lignes optiques se fait à l'aide d'un

Diagram illustrating the optical setup for a laser system, showing the path of the laser beam and the components involved.

Components and Labels:

- SOURCE LASER**: The primary light source.
- $\lambda/2 + \text{cube}$** : A half-wave plate and a cube beam splitter.
- Agrandisseur de faisceau**: Beam expander.
- Beam block**: A component used to block the beam.
- Flip-flap**: A mirror used to direct the beam.
- péricope**: A periscope.
- Microscope SHG**: Second Harmonic Generation microscope.
- TABLE AMOVIBLE**: Movable table.
- Ligne d'usage**: Usage line (indicated by a red dashed box).
- Ligne d'imagerie**: Imaging line (indicated by a red dashed box).
- Renvoi vers le setup initial**: Return to the initial setup.

Beam Path Description:

- The laser beam originates from the **SOURCE LASER**.
- It passes through a **$\lambda/2 + \text{cube}$** component.
- The beam then enters the **Agrandisseur de faisceau** (beam expander).
- The beam is reflected by a **Flip-flap** mirror.
- The beam passes through a **péricope** (periscope).
- The beam enters the **Microscope SHG** section, which is mounted on a **TABLE AMOVIBLE** (movable table).
- The beam is split into two paths:
 - Ligne d'usage** (Usage line): This path involves a beam splitter, a **Beam block**, and a **péricope**.
 - Ligne d'imagerie** (Imaging line): This path involves a beam splitter, a **Beam block**, and a **péricope**.
- The beam is reflected by a **Flip-flap** mirror, labeled **Renvoi vers le setup initial** (Return to the initial setup).

Ce dispositif permet de visualiser spécifiquement le signal de SHG du collagène de type I à l'intérieur d'un échantillon très rapidement après l'usinage.

CHAPITRE III.

Micro-usinage dans le volume d'un hydrogel de gélatine par laser femtoseconde

Ce chapitre présente les résultats expérimentaux obtenus lors de l'usinage par laser femtoseconde de blocs constitués d'un hydrogel de gélatine. Ce chapitre vient, tout d'abord, définir les paramètres laser permettant d'usiner des canaux réguliers dans le volume de blocs de gélatine en étudiant l'influence de ces paramètres sur la qualité de l'usinage. Puis, il s'intéresse à la dynamique des bulles de cavitation à l'intérieur d'un gel riche en eau. Il apporte, également, quelques éléments dans la compréhension des mécanismes de dégradation de ce matériau par cavitation. Ce chapitre s'articule sous la forme des deux articles acceptés pendant ma thèse. Le premier est le proceeding d'une conférence présentée lors du salon international BIOS 2019 à San Francisco s'intitulant « ***Biofabrication of a vascular capillary by ultra-short laser pulses*** » [122]. Le second article est publié dans Laser in Medical Sciences et s'intitule « ***Intra-volume processing of gelatine hydrogel by femtosecond laser-induced cavitation*** » [123]. Chacun de ces deux articles sera brièvement introduit et résumé. En fin de chapitre, un bilan et des perspectives communs permettront d'établir une fenêtre paramétrique d'étude pour la réalisation d'un canal à l'intérieur d'une microfibre.

I. Biofabrication of a vascular capillary by ultra-short laser pulses

I.1. Présentation du premier article

Ces travaux ont fait l'objet d'un proceeding réalisé pour la conférence BIOS 2019 présentée lors du salon Photonics West 2019, le 2 février à San Francisco et s'intitule "*Biofabrication of a vascular capillary by ultra-short laser pulses*" [122].

L'objectif de cette première étude était de définir une fenêtre de paramètres laser réduite pour laquelle il était possible de réaliser des canaux dans le volume de blocs constitués d'un hydrogel de gélatine. Dans ce but, l'influence de trois paramètres laser a été étudiée : F : la fluence laser, (quantité d'énergie déposée par unité de surface), D : la profondeur du point focal laser par rapport à la surface du bloc de gélatine et N : le nombre de passages laser. Ces trois paramètres sont étudiés avec l'utilisation d'un laser à impulsions ultracourtes d'une durée de 350 fs, d'une longueur d'onde située dans le proche infrarouge à 1030 nm et d'un objectif de grossissement 20X et d'ouverture numérique $ON = 0,4$ permettant d'obtenir une absorption multiphotonique dans le volume de l'hydrogel transparent. Pour cette étude, la cadence laser était maintenue à une valeur de 50 kHz et la vitesse de déplacement des platines à 0,5 mm/s.

Afin de montrer la pertinence de la modélisation de l'interaction laser-collagène dans les microfibres à l'aide d'un bloc de gélatine, ce proceeding compare les résultats obtenus dans la gélatine avec les premiers résultats obtenus à l'intérieur des microfibres à cœur de collagène pour des paramètres laser similaires. Cette comparaison s'accompagne d'une première réflexion sur la mortalité cellulaire et ses causes lors de l'usinage qui sera discutée plus en détail dans le chapitre suivant.

I.2. L'article

Biofabrication of a vascular capillary by ultra-short laser pulses

Isabel VERIT^{1,2}, Claire RIGOTHIER², Laura GEMINI¹, Julie PRETERRE², Clémentine JAVAUX-LEGER¹, Jean-Christophe FRICAIN², Rainer KLING¹

¹ Centre Technologique Optique et Lasers ALPhANOV

² Laboratoire INSERM U1026 BioTis, Université de Bordeaux

ABSTRACT

Over the last ten years, the need for organ donors for transplants became critical due to the increased incidence of organ failure [1]. Today, the development of tissue engineering (TE) appears as the best opportunity to overcome this shortage. TE is an interdisciplinary emerging field that aims to restore and maintain human tissue functions by applying engineering and life science principles [2]. However, one of its greatest challenges is the vascularization of tissue for the transport of oxygen and nutrients to prevent cell death.

Here an innovative method is proposed to answer vascularization issues and the difficulty to create blood microcapillaries constructs, with a special interest to renal microcapillaries, which allow blood filtration. A cell-bilayer covering a tubular collagen I matrix with a diameter of about 150µm was developed and treated by ultra-short pulse (USP) laser processing in order to selectively remove the collagen core to create a capillary. The precise laser treatment allows indeed for the creation of voids in the fibre-shaped construct which results in the final formation of the capillary.

Firstly, experiments were carried on a 2D model of gelatine hydrogel. The hydrogel-laser interaction was parametrically investigated in order to define a window of laser process parameters allowing the creation of voids within the hydrogel. The best window of laser process parameters was then applied to the 3D cell bilayer microfibres. Confocal microscopy examination demonstrated the presence of a lumen through the collagen I matrix without extended damage to surrounding cells. Live/Dead[®] assays were also carried to assess cell viability.

Keywords: Ultra-short pulses laser processing, glomerular microcapillary, laser-collagen interaction, laser micromachining of blood capillaries

1. INTRODUCTION

In the last decade, tissue engineering (TE) has gained more and more attention, bringing new hope to the development of biological substitutes. Indeed, its main objective is to reproduce *in vitro*, a functional organ using appropriate cells and scaffolds that would closely reproduce the architecture, physiology and morphology of the native organ. Nevertheless, several issues still must be addressed in order to be able to reproduce accurately complex three-dimensional architectures. One of the main challenges remains the vascularization of bioengineered constructs to replace blood vessels, which supply nutrients and oxygen while eliminating cellular waste and carbon dioxide in *in vivo* systems [3]. Only thin or poorly vascularized tissues such as epidermis [4] or bladder tissue [5] have been successfully created and implanted.

Currently, several strategies exist to produce blood-vessel capillaries. For instance, microfluidic approaches guiding directional migration of endothelial cells co-cultured with fibroblasts resulted to a blood vessel capillary-like structure [6], [7]. However, the use of fibroblasts while promoting endothelial cell lumen in the formation of new blood vessels, is not suited for all kind of organs capillary such as those of kidneys. Another strategy is the use of trapped growth factors in the extracellular matrix to stimulate the formation of micro-blood vessels [8], [9]. The accelerated formation of capillaries allows a rapid access to nutrients and oxygen after transplantation *in vivo* but not fast enough for thicker tissues where transplanted cells, far away from the surgical bond, might undergo apoptosis. Bertassoni *et al.* utilizes 3D micro-molding techniques to fabricate microchannel networks within photocrosslinkable hydrogel constructs [10].

Optical Interactions with Tissue and Cells XXX, edited by Hope Thomas Beier, Bennett L. Ibey, Proc. of SPIE Vol. 10876, 1087603 · © 2019 SPIE · CCC code: 1605-7422/19/\$18 · doi: 10.1117/12.2509754

Proc. of SPIE Vol. 10876 1087603-1

Nevertheless, also in this case, the capillary network, embedded in a hydrogel construct, is limited to lab-on-a-chip applications with no possibility to be adapted to porous renal blood capillary.

Lasers are commonly used in several medical applications as for skin healing process [11], cornea surgery [12], [13] and in biological research as for instance for laser-assisted bioprinting [14], [15]. Lasers processing proved indeed to be a chemical-free, non-invasive, high precision method to operate on biological compounds, limiting contamination risks. Moreover, the use of infrared (IR) laser sources with pulse duration in the femtosecond (fs) regime allows minimizing the laser induced thermal effects in the interaction zone with the possibility to work within the wavelength biological window [16]. Finally, the combination of a fs laser source to a high numerical aperture objective allows to reach laser intensity high enough to obtain multi-photon absorption within transparent materials, such as hydrogels, and to confine the laser-induced modification in the material volume. With regard to tissue vascularization, recent studies have shown the possibility to achieve intra-volume laser processing of soft silk protein hydrogel and of collagen I with a 810nm [17] and 775nm-80fs laser source [18], respectively; Hribar *et al.* employed collagen fibrils doped with Au nanoparticles to enhance and localize the absorption of the laser beam (100fs pulse duration, 800nm wavelength) within the fibrils [19].

The overall goal of this work is to develop a 3D renal blood capillary system through fs laser processing. Glomeruli, renal capillary network, are crucial in blood filtration mechanism but their generation by tissue engineering is still a great challenge [20]. Following the work of Kalinsky *et al.* [21], a 3D shell-core microfibre was obtained by composing a core of collagen I with an endothelial cell inner layer and a podocyte outer layer. Formation of glomerular basement membrane was observed at the cell interface.

The primary objective was to remove the collagen core by USP laser processing in order to create lumen through the matrix without damaging the outer cell layers. The study was carried with a step-like approach to appreciate firstly the laser-matrix interaction and secondly the cell behaviour upon laser interaction. Initially, a matrix of gelatine from porcine skin, type-A, mimicking the behaviour of the system collagen I + endothelial cells layer, was employed for the experiments. The effect of several process parameters on the formation of voids within the gelatine volume and the integrity of the gelatine surface, was evaluated by varying the number of passes N , the laser fluence Φ , and the position D of the focus in the gelatine volume. A window of laser process parameters for which voids are formed in the gelatine volume without damaging the gelatine surface, was selected. These sets of process parameters were then applied to laser processing of the 3D microfibre in order to create voids into the renal microcapillary without damaging the cell layers. The presence of a lumen and cellular viability have been assessed by Live/Dead[®] assays.

2. MATERIAL & METHODS

Laser Processing Workstation: All experiments were carried using a femtosecond laser source by Amplitude Systems (Satsuma HP3) running at 1030nm central wavelength with a pulse duration of 350fs. The gaussian linearly-polarized laser beam was firstly sent through a couple of half-wave plate and polarizer for fine adjustment of the laser pulse energy. For experiments on hydrogel, the laser beam was then enlarged of a factor 3 by a beam expander before entering a 0.3 NA microscope objective, which allowed to reach a focused beam spot with a diameter of about 3 μ m. For the final experiments on the 3D microfibres, the beam expander was removed to reach a focused beam diameter of about 5 μ m after the 0.3 NA microscope objective. Beam diameter was measured by beam profiling CCD camera (WimCamD, Data Ray Inc.). The samples were placed on computer-controlled XYZ translation stages (ALIO XYLinear Motion System and ALIO Precision Crossed Roller Bearing Linear Stages for experiments on hydrogels and ALIO Hexapod 6-axis motion System for experiments on 3D microfibres). For all experiments the repetition rate of the laser was kept at 50kHz and the translational speed of the stages at 0.5mm/s in order to keep the intra-pulse overlap at about 100% in the focal plane. Straight lines were machined in the volume of hydrogels and 3D microfibres with laser pulse energy and number of successive passes varying in the range 1-2.2 μ J and 1-10, respectively. The depth of the focal point within the material volume was varied from the reference material surface, defined as $z=0\mu$ m, down to $z=150\mu$ m. For sake of repeatability, experiments were repeated three times for each set of laser parameter.

Cell culture: Glomerular human endothelial cells (GEC), conditionally immortalized by temperature-sensitive gene SV40, were cultured with Basal Medium GMV2 (Promocell, Heidelberg, Germany) supplemented with 30mg/mL gentamicin at 33°C and with 5% CO₂. GEC were differentiated after 5 days at 37°C. Podocyte cell line was obtained from human nephrectomy specimen and conditionally immortalized by temperature-sensitive gene SV40. The cells were

cultured with RPMI 1640 medium and Glutamax 1 (Life Technologies, Carlsbad, USA) supplemented with 10% fetal calf serum (GE Healthcare, Little Chalfont, United Kingdom), 1% Insulin-Transferrin-Selenium (Gibco Life technologies, Carlsbad, USA), 100µg/mL streptomycin and 100µg/mL Penicillin (Life Technologies, Carlsbad, USA) at 33°C and with 5% CO₂. Podocytes were differentiated after 14 days at 37°C.

Gelatin Preparation: 2g of gelatin powder from porcine skin, type A was mixed with 100mL of distilled water. The dissolution of gelatin crystals was done by means of a bath water of 37°C for 20 minutes. Gelatin was colored by adding 10µL /mL trypan blue solution. It was poured in a well of a 6-well culture plates, 2.5mL per well, and then cooled down at 4°C overnight. The micromachined area were imaged via conventional microscopy and voids were highlighted with epifluorescence microscopy after applying a fluorescein dye overnight.

Cell-laden Microfibres: Cell-laden microfibres were prepared as described in reference [21]. Lines were micromachined into the collagen core through the cell layers. Cells were secondly stained with a Live/Dead® viability kit and imaged via confocal fluorescence microscopy and conventional microscopy.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Influence of fluence (Φ), depth (D) and number of passes (N) on gelatine

Optical microscopy was employed to evaluate the laser-induced modification on the surface and in the volume of the gelatine hydrogels. Figure 1 presents the evolution of the laser-induced modification in the gelatine hydrogel for different laser fluences (Φ) ranging from Φ = 6.55 J.cm⁻² to Φ = 18.35 J.cm⁻² and different focal plane depth (D) from z=0µm (corresponding to the gelatine surface) down to z=150µm. For each case of focal plane depth D, the images were recorded accordingly at the same depth from the surface. The number of passes was fixed to N=1. Correspondingly, Figure 2 shows the average width of the processed lines for the same sets of parameters. For each case, 10 measurements were carried at different points on the line to obtain an average value.

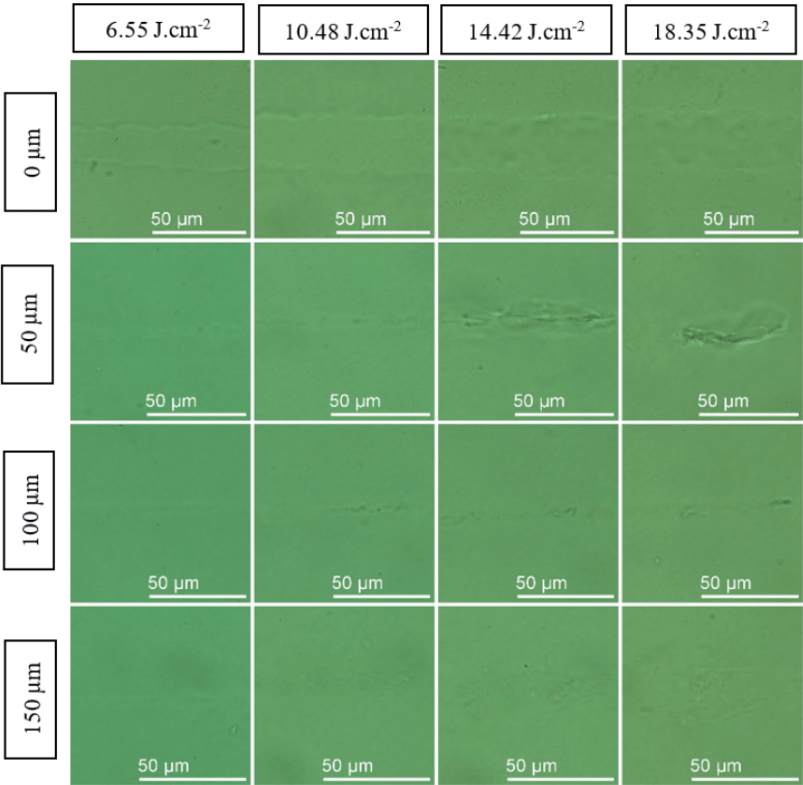


Figure1. Optical microscope images of gelatine hydrogel after USP laser treatment showing the evolution of the in-volume processed area when the laser power and the depth of focus vary. For each case of focal plane depth D, the images were recorded accordingly at the same depth from the surface. The number of passes was fixed to N=1.

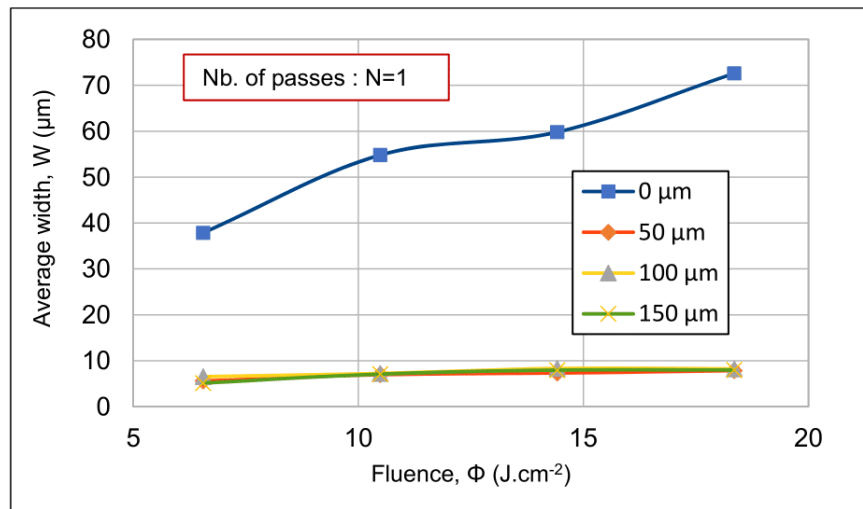


Figure 2. Average modification area width values, W , versus the laser fluence, Φ for $N=1$, $\lambda=1030\text{nm}$ at 50kHz .

At $D=0\mu\text{m}$, large grooves are observed on the gelatine hydrogel surface whose average width varies from $37\mu\text{m}$ to $73\mu\text{m}$ when the laser fluence increases from $\Phi=6.55\text{J.cm}^{-2}$ to $\Phi=18.35\text{J.cm}^{-2}$, highlighting strong thermal diffusion on the gelatine surface upon interaction with the laser.

For $D\geq 50\mu\text{m}$, the average width of the in-volume modified areas decrease to values lower than $10\mu\text{m}$ for all cases, highlighting a more confined interaction in the focal point with respect to surface interaction.

For $D=50\mu\text{m}$, a strong visible modification of gelatine in the volume is observed above 10.48 J.cm^{-2} only with small cavitation bubbles, eventually leading to voids. However, with the increase of laser fluence, at $D=50\mu\text{m}$, cracks are visible along the micro-processed regions leading to unreliable processing.

For $D\geq 100\mu\text{m}$, in-volume modifications are difficult to evaluate by optical microscope and therefore successive analyses were carried by fluorescence microscopy. To increase the image contrast, fluorescein was poured on the surface of the gelatine prior to observation and let sink over-night so that the hydrogel was finally soaked with the fluorescent dye. In the images, in-volume voids appear black while the gelatine appears green.

Results from fluorescent microscopy show that for $D=100\mu\text{m}$ discontinuous voids, surrounded by a few cracks and irregularities, can be detected for $\Phi \geq 14.42\text{ J.cm}^{-2}$ and $N=1$. At $D=150\mu\text{m}$, no voids are detected even at the highest laser fluence, while irregular modifications of the gelatine structure can be observed. The fluence threshold for void formation in the gelatine volume increases as the depth of the focal point increases within the gelatine, highlighting a non-negligible absorption of the laser energy by the gelatine volume before the focal point.

To obtain more defined voids and channels in the gelatine volume to observe by fluorescence microscopy, additional laser irradiations were carried on gelatine with the same values of fluence and focus depth but increasing the number of successive scans N from 1 to 5 and 10.

For sake of clearness in the results discussion, four levels of laser-induced in-volume modification obtained with different combinations of laser parameters in the gelatine were defined. Figure 3 presents fluorescence microscopy images of these representative laser-induced modifications levels.

A: Only slight modifications of gelatine are observed, no full-formed voids are detected

B: Several discontinuous voids are detected but no proper channel into the volume is formed

C: Generation of a continuous channel into the volume of the gelatine

D: Cracks and significant deformation of the gelatine

Condition C represents the objective when evaluating the laser-induced modification.

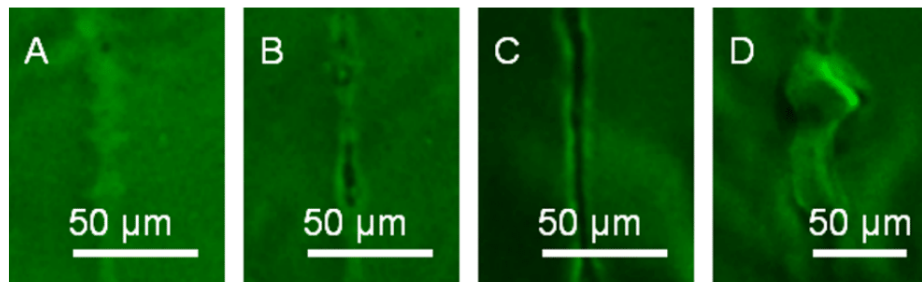


Figure 3. Fluorescence micrographs of gelatine after USP laser processing. Specifically, the images refer to irradiations with the following parameters: P=50mW, D=100µm, N=5 (A); P=80mW, D=100µm, N=5 (B); P=140mW, D=50µm, N=5 (C); P=110mW, D=150µm, N=10 (D)

Table 1 summarize the results obtained for all sets of process parameters with respect to the laser-induced modification levels previously introduced. The presence of cracks around the micromachined lines are labelled with one asterisk (*), two if the cracks are judged too numerous to make the process reliable. The sets of parameters corresponding to the classification C are highlighted in green.

Table 1. Results on laser-induced in-volume modification in gelatine classified into four different levels previously introduced, with respect to each specific set of laser parameters employed (fluence Φ , depth of focus D and number of passes N).

	$\Phi=6.55\text{J.cm}^{-2}$			$\Phi=10.48\text{J.cm}^{-2}$			$\Phi=14.42\text{J.cm}^{-2}$			$\Phi=18.35\text{J.cm}^{-2}$		
	N=1	N=5	N=10	N=1	N=5	N=10	N=1	N=5	N=10	N=1	N=5	N=10
D=50µm	A	B	B*	A	B	C*	B*	C**	C**	B*	C	C**
D=100µm	A	A	B	A	B	C*	B	B*	C*	B	B*	C*
D=150µm	A	A	B*	A	B	C*	A	B*	D**	A	B**	C**

The formation of full-formed channel is found in a narrow window of process parameters as the cumulative energy absorbed by the gelatine increases, that is either the fluence or the number of passes, until a deformation of these channels is observed at the highest cumulative energy. Nevertheless, all conditions classified as C led to crack formation around the irradiated regions. In particular, number of cracks increases with the increase of the number of passes. It is interesting to observe that when the laser is focused nearer the surface, i.e. D=50µm, channel formation is observed at lower number of passes compare to the cases $D \geq 100\mu\text{m}$. The nearest the focal plane is to the surface, the less important is the parasite absorption of the laser energy by the surrounding gelatine and the lowest in the number of passes necessary to produce voids. This result suggests that working with the laser beam focused at lower distance from the surface is favourable to obtain a cleaner channel. An approach at lower D, lower N and higher laser fluence might be preferred to obtain the generation of a fully-formed channel in the gelatine volume.

3.2 Micro-processing and cell viability in 3D cell bilayer microfibres

Further studies were carried on 3D cell bilayer microfibres with a fluence of $\Phi=11.80\text{J.cm}^{-2}$ slightly higher than the first value of fluence necessary to observe the formation of continuous voids in gelatine, and a number of passes of N=1 to account for the viability of the cell layer. Depth of focus D was varied from 50µm below the surface down to 140µm. Microscope images of the laser processed areas were taken by a CCD camera 5s after the laser interaction, so to highlight the immediate effect of laser interaction within the collagen I core. Fluorescence confocal microscopy with

Live/Dead[®] assays was employed the day after the laser processing to investigate the processed microfibre volume and cell viability.

Figure 4 shows the core of three different microfibres at $\Phi = 11.80 \text{ J.cm}^{-2}$ for three different focus depths : 50 μm , 100 μm and 140 μm . At D=50 μm (Fig. 4-I.a), a cavitation channel is formed by the accumulation of several cavitation bubbles into the collagen-I core. Increasing the depth of the laser focal point within the volume to D=100 μm (Fig. 4-II.a), only distinct bubbles are visible in the volume of the microfibres. Finally, for D=140 μm (Fig. 4-III.a), a weaker interaction is visible in the microfibre volume: a processed line is formed by either aggregation of several smaller cavitation bubbles or by simple modification of collagen properties. As observed for gelatine, shallow focus depths improve the cavitation phenomenon, that is the formation of voids, limiting the number of passes and this way preserving the cell integrity.

As observed by CCD camera images, just after laser interaction the immediate response within the collagen I core is the rapid formation of cavitation bubbles. After the laser impact, it is observed that these cavitation bubbles expand and slowly decreases in time, before completely vanishing. After complete collapse of the cavitation bubbles, voids can be formed within the volume or not. The reasons behind the likelihood of appearance of a void after the cavitation bubble collapse are still currently under investigation. The Live/Dead[®] confocal images (Fig. 4II.b, 4III.c) indicate the presence of voids after the collapse and disappearance of all cavitation bubbles. Voids are indicated in the images by a white arrow. Laser irradiation at D=100 μm leads to a discontinuous channel within the collagen core (Fig. 4II.b), while for D=140 μm hardly detectable voids are present in the microfibre volume (Fig. 4III.b).

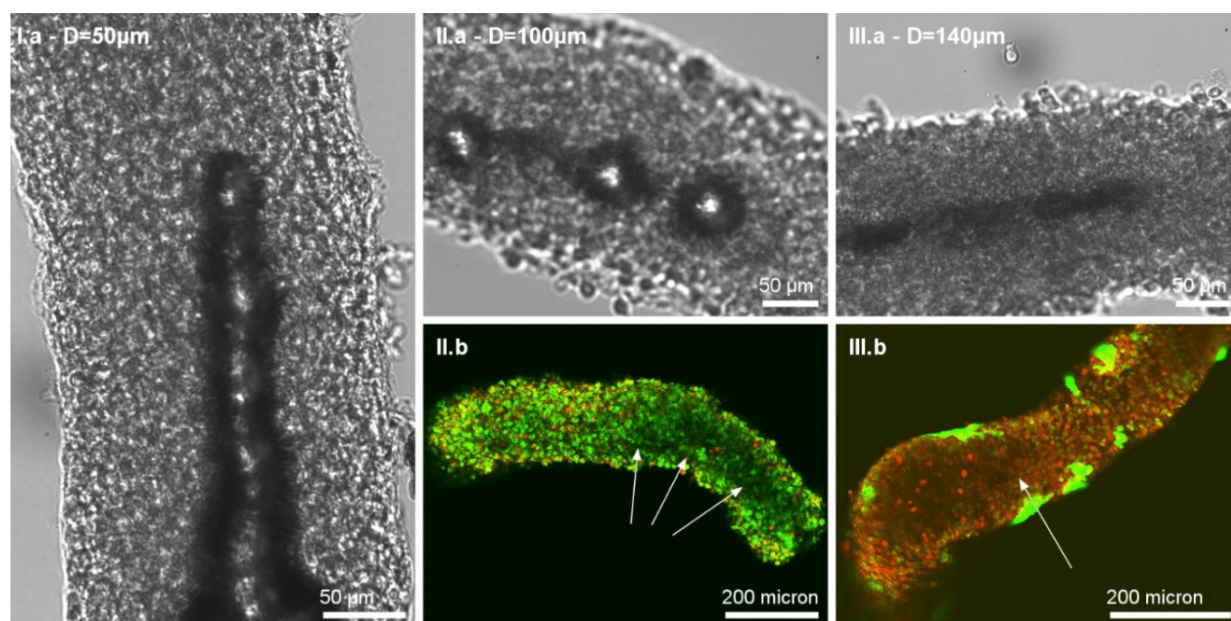


Figure 4. Optical microscopy (a) and confocal microscopy (b) images of the collagen I core of three microfibres (I, II and III). A Live/Dead[®] staining was applied prior to observation on fluorescence images. Green and red signals represent respectively live and dead cells (b). Fibres I, II and III were processing for $\Phi = 11.80 \text{ J.cm}^{-2}$ and $N=1$ and depth of focus of 50 μm , 100 μm and 140 μm respectively. White arrows in the images indicate the presence of voids within the microfibre volume

Live/Dead[®] analyses show an important cell death from the microfibre treatment. Indeed, numerous red spots, which refer to cell apoptosis, are found in all processed fibres with respect to a few large green nuclei, typical of living cell agglomerates. Nevertheless, the observed low cellular viability is mainly explained rather by the microfibre handling during transport and positioning before the laser processing than by the USP laser treatment itself. Fig. 5 presents an image of a microfibre kept in wet nutrient (Fig. 5A) and the same microfibre kept for 37 minutes in dry air environment (Fig. 5B) without any laser treatment. Fig. 5C presents a microfibre kept in wet nutrient and the same microfibre kept for 36 minutes in dry air environment during which a laser treatment was carried (Fig. 5D). It is possible to observe that the amount of dead cells in the case of laser treated microfibre is not significantly different

from the one of the non-laser-treated microfibrils after being kept in dry environment for the same amount of time. Solutions are currently considered to improve cell viability during the microfibre handling and laser processing.

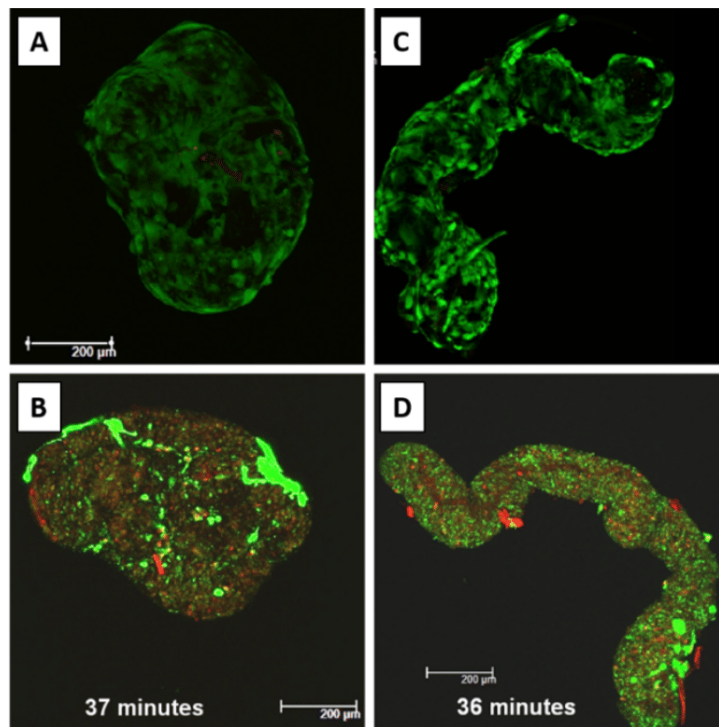


Fig. 5. Fluorescence microscopy images of microfibrils kept in wet nutrient (A, C) and the same microfibrils after 37 and 36 minutes (B, C), respectively, during which the microfibril was laser treated in the case D only.

4. CONCLUSION

The main goal of this work was to evaluate the possibility to develop a 3D renal blood capillary system through fs laser processing. A matrix of gelatine from porcine skin, type-A, mimicking the behaviour of the 3D shell-core microfibre system collagen I + endothelial cells layer, was firstly laser processed to define a window of parameters for which an in-volume continuous capillary channel could be observed. In gelatine volume, it was found that several cracks appear along the micro-processed areas, whose number increases either with the increase of the number of passes or the laser fluence until a deformation of the channels is observed at the highest cumulative energy. Working at shallow depths (D) with a fluence above $\Phi=14.42\text{J.cm}^{-2}$, a full-formed channel can be formed with a lower number of passes (N), thus, limiting the appearance of cracks.

Therefore, for all experiments in the 3D shell-core microfibre system collagen I + endothelial cells layer system, the number of passes N was limited to one pass in order to account for cell viability. The investigation of the influence of depth of focus and laser fluence on the gelatine matrix led to comparable results for the case of 3D microfibrils. Indeed, it was observed that for the 3D shell-core microfibre system, shallow depths enhance cavitation phenomenon by expansion of the cavitation bubbles themselves, finally leading to voids formation and the generation of continuous capillary channels in the microfibrils. Nevertheless, the formation of continuous capillary channels is not yet fully understood and further studies are necessary to evaluate the possibility to develop a 3D renal blood capillary system through USP laser processing. From the point of view of cell viability, it was shown that a more controlled protocol for microfibre handling is necessary to properly evaluate the real effect of laser processing on the cell death.

REFERENCES

- [1] G. M. Abouna, "Organ Shortage Crisis: Problems and Possible Solutions," *Transplant. Proc.*, 2008.
- [2] R. Langer and J. P. Vacanti, "1. ARTICLES Tissue Engineering," *Science (80-.)*, vol. 260, no. May, pp. 920–926, 1993.
- [3] E. C. Novosel, C. Kleinbans, and P. J. Kluger, "Vascularization is the key challenge in tissue engineering," *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2011.
- [4] S. G. Priya, H. Jungvid, and A. Kumar, "Skin Tissue Engineering for Tissue Repair and Regeneration," *Tissue Eng. Part B Rev.*, vol. 14, no. 1, pp. 105–118, 2008.
- [5] A. Atala, S. B. Bauer, S. Soker, J. J. Yoo, and A. B. Retik, "Tissue-engineered autologous bladders for patients needing cystoplasty," *Lancet*, vol. 367, no. 9518, pp. 1241–1246, 2006.
- [6] S. Chung, R. Sudo, P. J. MacK, C. R. Wan, V. Vickerman, and R. D. Kamm, "Cell migration into scaffolds under co-culture conditions in a microfluidic platform," *Lab Chip*, vol. 9, no. 2, pp. 269–275, 2009.
- [7] R. Sudo *et al.*, "Transport-mediated angiogenesis in 3D epithelial coculture," *FASEB J.*, vol. 23, no. 7, pp. 2155–2164, 2009.
- [8] J. E. Saik, M. K. McHale, and J. L. West, "Biofunctional Materials for Directing Vascular Development," *Curr. Vasc. Pharmacol.*, vol. 10, no. 3, pp. 331–341, 2012.
- [9] J. E. Leslie-Barbick, J. E. Saik, D. J. Gould, M. E. Dickinson, and J. L. West, "The promotion of microvasculature formation in poly(ethylene glycol) diacrylate hydrogels by an immobilized VEGF-mimetic peptide," *Biomaterials*, vol. 32, no. 25, pp. 5782–5789, 2011.
- [10] L. E. Bertassoni *et al.*, "Hydrogel bioprinted microchannel networks for vascularization of tissue engineering constructs," *Lab Chip*, vol. 14, no. 13, pp. 2202–2211, 2014.
- [11] S. Mordon, A. Capon, N. Fournier, and G. Iarmarcovai, "[Thermal lasers and skin cicatrization]," *Med Sci*, vol. 26, pp. 89–94, 2010.
- [12] D. Donate *et al.*, "Laser femtoseconde: Système de micro-usinage pour chirurgie de la cornée," *J. Fr. Ophtalmol.*, vol. 27, no. 7, pp. 783–789, 2004.
- [13] D. Touboul *et al.*, "Avantages et inconvénients du microkératome laser femtoseconde," *J. Fr. Ophtalmol.*, vol. 28, no. 5, pp. 535–546, 2005.
- [14] I. T. Ozbolat, "Bioprinting scale-up tissue and organ constructs for transplantation," *Trends Biotechnol.*, vol. 33, no. 7, pp. 395–400, 2015.
- [15] H. W. Kang, S. J. Lee, I. K. Ko, C. Kengla, J. J. Yoo, and A. Atala, "A 3D bioprinting system to produce human-scale tissue constructs with structural integrity," *Nat. Biotechnol.*, vol. 34, no. 3, pp. 312–319, 2016.
- [16] E. Hemmer, A. Benayas, F. Légaré, and F. Vetrone, "Exploiting the biological windows: Current perspectives on fluorescent bioprobes emitting above 1000 nm," *Nanoscale Horizons*, vol. 1, no. 3, pp. 168–184, 2016.
- [17] M. B. Applegate *et al.*, "Laser-based three-dimensional multiscale micropatterning of biocompatible hydrogels for customized tissue engineering scaffolds," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2015.
- [18] N. I. Smith, K. Fujita, O. Nakamura, and S. Kawata, "Three-dimensional subsurface microprocessing of collagen by ultrashort laser pulses," *Appl. Phys. Lett.*, 2001.
- [19] K. C. Hribar, K. Meggs, J. Liu, W. Zhu, X. Qu, and S. Chen, "Three-dimensional direct cell patterning in collagen hydrogels with near-infrared femtosecond laser," *Sci. Rep.*, 2015.
- [20] A. Joraku, K. A. Stern, A. Atala, and J. J. Yoo, "In vitro generation of three-dimensional renal structures," *Methods*, 2009.
- [21] J. Kalisky *et al.*, "An easy-to-use and versatile method for building cell-laden microfibres," *Sci. Rep.*, 2016.

I.3. Discussion

L'influence des trois paramètres laser (fluence, profondeur du point focal et nombre de passages laser) sur la création de canaux réguliers dans l'hydrogel de gélatine est résumée ci-dessous.

I.3.1. Influence de la profondeur de focalisation laser (D)

L'étude de l'influence de la profondeur du point focal a montré deux phénomènes. Tout d'abord, lorsque le point focal laser est ciblé à une profondeur $D \geq 50 \mu\text{m}$ par rapport à la surface du bloc de gélatine, l'interaction laser reste confinée au niveau du plan focal tandis que la surface des blocs d'hydrogel est préservée.

Enfin, une partie non négligeable de l'énergie laser qui traverse l'échantillon avant d'atteindre le point focal est absorbée. Plus le faisceau est focalisé en profondeur, plus la fluence minimale requise pour créer des cavités intravolumiques augmente. Pour une profondeur $D > 100 \mu\text{m}$, l'absorption du faisceau par le milieu environnant empêche d'usiner l'hydrogel avec une bonne qualité d'usinage. Une faible profondeur de focalisation permet de diminuer l'apport énergétique nécessaire à l'obtention de canaux.

I.3.2. Influence de l'énergie cumulée (Fluence, F, et Nombre de passages laser, N)

Pour une profondeur de focalisation donnée, lorsque la quantité d'énergie laser cumulée pendant la durée totale de l'usinage augmente, la probabilité de créer des cavités ou des canaux intravolumiques augmente. Cela est vrai jusqu'à atteindre un certain seuil énergétique où l'énergie cumulée devient trop importante et entraîne alors une déstructuration des canaux formés. L'augmentation de l'énergie laser cumulée au point focal peut se faire en augmentant soit la fluence soit le nombre de passages. L'augmentation contrôlée de l'énergie cumulée peut ainsi favoriser la formation de canaux intravolumiques.

Cependant, cette augmentation de l'énergie s'accompagne de la formation d'irrégularités comme des fissures (ou des cracs) apparaissant autour de la zone irradiée et venant déformer et fragiliser le matériau environnant. Ces irrégularités sont observées pour la quasi-totalité des paramètres lasers mais sont d'autant plus nombreuses que le nombre de passages laser est élevé. Pour un nombre de passages $N > 5$, le nombre de cracs est jugé trop important pour obtenir un canal régulier de façon contrôlée. Un N élevé diminue la répétabilité du procédé. Afin d'obtenir des canaux intravolumiques réguliers, il est donc préférable de favoriser une fluence élevée avec un faible nombre de passages laser.

Ces résultats suggèrent qu'une approche à faible profondeur de focalisation, faible nombre de passages laser et avec une fluence légèrement plus haute que le seuil de formation des

cavités doit être favorisée dans le but d'obtenir des canaux réguliers dans le volume d'un hydrogel de gélatine.

I.3.3. Adaptation des paramètres lasers à l'usinage des microfibres

A partir des résultats obtenus dans les blocs de gélatine, les trois paramètres laser étudiés – la profondeur de focalisation, la fluence et le nombre de passages laser – ont été adaptés pour générer des canaux dans le cœur de collagène des microfibres avec cellules. Pour favoriser la formation des canaux et préserver la viabilité cellulaire, le nombre de passages laser a été limité à $N = 1$ et la fluence fixée à une valeur de $F = 11,80 \text{ J.cm}^{-2}$. En variant la profondeur du point focal entre $D = 50 \text{ }\mu\text{m}$ et $D = 140 \text{ }\mu\text{m}$, on a pu constater qu'une faible profondeur favorisait également la formation de cavités à l'intérieur du collagène comme dans le modèle de gélatine. Des canaux intravolumiques ont pu être observés jusqu'à une profondeur de $100 \text{ }\mu\text{m}$. En revanche, seule de très petites cavités ont pu être repérées à $D = 140 \text{ }\mu\text{m}$.

Cette étude sur les microfibres avec cellules montre des résultats préliminaires cohérents avec ceux obtenus sur le modèle de gélatine.

I.3.4. Viabilité cellulaire après usinage

Les essais Live/Dead® réalisés avant et après usinage laser ont révélés une grande mortalité parmi les cellules de la couche externe. Cependant, cette mortalité est majoritairement associée à la manipulation de la microfibre et à son manque d'hydratation pendant l'usinage plutôt qu'au traitement laser. En effet, 2 fibres ont été manipulées et conservées de la même manière et pendant la même durée avec une faible hydratation. En revanche, seule une seule de ces deux fibres a reçu le traitement laser. Après analyse de leur viabilité cellulaire, le taux de mortalité cellulaire est équivalent pour les deux fibres, avec ou sans traitement laser. L'amélioration des conditions de manipulations et d'hydratation des fibres permettront d'améliorer la viabilité cellulaire.

I.4 Conclusion

Les résultats concluent sur la nécessité de favoriser une approche à faible profondeur de tir ($D \leq 100 \text{ }\mu\text{m}$), avec un faible nombre de passages laser ($N \leq 5$) et une fluence légèrement supérieure au seuil de formation des cavités intravolumiques ($F \geq 14,42 \text{ J.cm}^{-2}$). En effet, une faible profondeur permet de minimiser les phénomènes d'absorption parasites par l'ensemble du milieu environnant tandis que l'accumulation thermique et donc par extension, les dommages en dehors du plan focal peuvent être réduits en privilégiant un faible nombre de passages avec une plus forte fluence. Cependant, après optimisation de ces trois paramètres

lasers, un nombre conséquent de cracs est toujours généré autour des zones irradiées. Ces fissures témoignent d'une accumulation thermique encore trop importante, rendant l'usinage difficilement contrôlable. La diminution de ces phénomènes thermiques est le sujet de notre second article.

Enfin, l'adaptation des résultats sur gélatine à l'usinage de microfibres avec cellules ont montré qu'un comportement proche était observé dans le cœur de collagène pour des paramètres lasers identiques. Toutefois, une étude approfondie des causes de la mortalité et du conditionnement des fibres est nécessaire pour améliorer la viabilité cellulaire pendant l'usinage.

II. Intra-volume processing of gelatine hydrogel by femtosecond laser-induced cavitation

II.1. Présentation de l'article

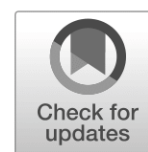
Le second article s'intitule "*Intra-volume processing of gelatine hydrogel by femtosecond laser-induced cavitation*" [123] et a été publié en juin 2020 dans la revue Lasers in Medical Science.

Dans l'optique d'améliorer la qualité de l'usinage sur gélatine, une optimisation des paramètres lasers influençant l'accumulation thermique a été réalisée. Ces deux paramètres sont le taux de répétition laser également appelé cadence laser ($RR = \text{Repetition Rate}$) et le taux de recouvrement spatiale entre deux impulsions laser consécutives ($OL = \text{OverLap}$). Les effets de ces deux paramètres sont exprimés en fonction de la dose *i.e.* de l'énergie cumulée totale absorbée par le matériau par unité de surface (en J.cm^{-2}). La dose énergétique augmente lorsque le taux de répétition laser augmente pour une vitesse de déplacement des platines fixée ou lorsque la vitesse de déplacement diminue pour un taux de répétition laser donné.

Pour cette seconde étude, les conditions précédentes ont été conservées avec notamment l'utilisation d'un laser à 350 fs, 1030 nm et d'un objectif d'ouverture numérique $ON = 0,4$. En revanche, la profondeur de focalisation D , la fluence F et le nombre de passages laser N , ont été fixés respectivement à $D = 100 \mu\text{m}$, $F = 24,54 \text{ J.cm}^{-2}$ et $N = 5$ selon l'étude précédente. L'influence de la cadence laser (RR) a été étudiée sur la plage 10 – 50 kHz et celle du taux de recouvrement (OL) sur la plage 26 – 98 %. La valeur du taux de recouvrement entre deux impulsions successives était modifiée en jouant sur la vitesse de déplacement des platines. Pour un taux de recouvrement de 26 % ou de 98 %, les vitesses de déplacement des platines correspondantes étaient respectivement de 120 mm/s ou de 0,5 mm/s et la dose associée valait respectivement 165 J.cm^{-2} ou 7907 J.cm^{-2} .

Les mécanismes de dégradation dans la gélatine et les mécanismes responsables de la formation des canaux sont également abordés. Dans ce but, l'influence de la cadence laser et du recouvrement sur le comportement et les caractéristiques des bulles de cavitation (taille, nombre, forme, vitesses d'expansion et de décroissance) a été étudiée en deux temps. Le premier temps s'est basé sur les photos des bulles de cavitation formées 5 s après l'usinage laser, tandis que le deuxième temps s'est appuyé sur l'aspect des blocs de gélatine 24 heures après l'usinage laser à l'aide de photos issues d'un microscope à épifluorescence. Cette analyse est étayée par la mesure des propriétés rhéologiques de l'hydrogel de gélatine.

II.2. L'article



Intra-volume processing of gelatine hydrogel by femtosecond laser-induced cavitation

Isabel Vérit^{1,2} · Laura Gemini¹ · Jean-Christophe Fricain^{2,3} · Rainer Kling¹ · Claire Rigothier^{2,4}

Received: 23 April 2020 / Accepted: 16 June 2020

© Springer-Verlag London Ltd., part of Springer Nature 2020

Abstract

Cell oxygenation and nutrition are crucial for the viability of tissue-engineered constructs, and different alternatives are currently being developed to achieve an adequate vascularisation of the engineered tissue. One of the alternatives is the generation of channel-like patterns in a bioconstruct. Here, the formation of full-formed channels inside hydrogels by laser-induced cavitation was investigated. A near-infrared, femtosecond laser beam focused with a high numerical aperture was employed to obtain intra-volume modifications of a block of gelatine hydrogel. Characterisation of the laser-processed gelatine was carried out by optical microscopy and epifluorescence microscopy right after and 24 h after the laser process. Rheology analyses on the unprocessed gelatine blocks were conducted to better understand the cavitation mechanism taking place during the intense laser interaction. Different cavitation patterns were observed at varying dose values by changing the repetition rate and the overlap between successive pulses while keeping the laser fluence and the number of passes fixed. This way, cavitation bubble features and behaviour can be controlled to optimise the formation of intra-volume channels in the gelatine volume. Results showed that the generation of fully formed channels was linked to the formation of large non-spherical cavitation bubbles during the laser interaction at high dose and low repetition rates. In conclusion, the formation of fully formed channels was made possible with a near-infrared, femtosecond laser beam strongly focused inside gelatine hydrogel blocks through laser-induced cavitation at high dose and low repetition rates.

Keywords Femtosecond laser-gelatine interaction · Laser-induced cavitation · Microvascularisation · Laser-induced intravolumique channels

Introduction

The generation of vascular networks is fundamental to provide long-term oxygenation and nutrition to cells within large-volume tissue-engineered constructs and maintain high cell viability [1, 2]. Cell viability, as well as fundamental cellular functions, such as proliferation, adhesion or differentiation, is

strongly influenced by the surrounding microenvironment [3–5]. High-water-content polymer networks known as hydrogels and more specifically collagen and gelatine hydrogels are major components of the extracellular matrix and provide a favourable microenvironment in tissue engineering to guide cell behaviours inside scaffold or bioengineering constructs [6–8]. To generate tissue-engineered constructs, specific 2D and 3D shaping techniques may be needed to control the topography and architecture of soft transparent materials with a micrometric resolution, while maintaining a favourable cell microenvironment. While 3D printing, [9, 10] or stereolithography [11] offers the possibility to build 3D structures in an additive fashion, the creation of vascular networks within hydrogels without impacting the surroundings microenvironment is only achievable with photonics technologies as ultra-fast lasers [12–16]. Indeed, femtosecond (fs) laser technology combined with high numerical aperture optics allows achieving highly localised intra-volume modification of transparent materials by multi-photon ionisation while

✉ Isabel Vérit
isabel.verit@alphanov.com

¹ ALPhANOV, Institut d'Optique d'Aquitaine, Talence, France

² Tissue Bioengineering, Université de Bordeaux, INSERM U1026, Bordeaux, France

³ Service d'Odontologie et de Santé Buccale, Centre Hospitalier Universitaire de Bordeaux, Bordeaux, France

⁴ Service de Néphrologie, Transplantation, Dialyse et Aphérèse, Centre Hospitalier Universitaire de Bordeaux, Bordeaux, France

minimising the heat-affected zone surrounding the processed area [17, 18]. Moreover, the use of infrared laser sources offers the possibility to work in the biological window which enables reaching deeper regions in biological tissue without affecting more superficial layers [19]. This way, ultra-fast laser may enable the generation of channel-like patterns in hydrogels, which are the formation of an ultimate vascular network, while minimising possible detrimental effects for cells and their microenvironment.

Within the frame of photonic technologies, most studies focus their works on laser-induced channels within synthetic polymers or animal proteins far from human extracellular matrix proteins because of their superior stability. To our knowledge, just a few studies on animal-based gelatine hydrogel-laser interaction can be found in literature despite its similarity to the biological environment macromolecules [20]. In the context of vascularised systems, Applegate et al. produced a 3D branching pattern in silk hydrogel by irradiation with a 100-fs laser at repetition rate of 80 MHz and wavelength of 810 nm. High-resolution intra-volume features were generated through nearly 1 cm of material thanks to the high robustness and low absorption of silk hydrogels at this specific wavelength [14]. Hribar et al. employed collagen fibrils doped with Au nanoparticles to enhance and localise the absorption of a 800 nm–100 fs–80 MHz laser beam within the fibrils [15]. Using pure collagen hydrogel and an 80 fs–775 nm–82 MHz laser beam, Smith et al. were limited in depth to 30 μ m from the hydrogel surface because of its turbidity [16]. Gaspard et al. observed a superficial nano-foaming layer formation after UV laser irradiation and the generation of craters which remain on the surface of collagen and gelatine films after green and IR laser exposure at 11 MHz with a 60 fs laser beam [21, 22].

A common characteristic of these works is the use of low-energy laser pulses with repetition rates of the order of tens of MHz. In this regime, nano-surgery of cells and tissues is achieved at pulse energies well below the tissue optical breakdown threshold, and laser-induced modifications are not related to heating effects or thermoelastic stresses. Nevertheless, high water content materials such as gelatine hydrogels undergo degradation primarily through bubble cavitation rather than ionisation of polymeric chains [23]. In high repetition rate regime, if the energy is raised to enter a regime of cavitation and transient bubble formation, cumulative effects are likely to occur leading to tissue dissociation. On the other hand, when higher pulse energy and lower repetition rate regimes are considered, the mechanical and thermal events induced by subsequent pulses can be more finely tuned and void formation can be achieved in a controlled manner above the material optical breakdown threshold [13]. Oujja et al. studied the premises of laser-induced cavities by creating intra-volume voxel up to 180 μ m below the

surface of transparent bulk gelatine by irradiation with a 30-fs laser beam at 1 kHz repetition rate and 800 nm wavelength [20].

To extend the possibility of fs laser-induced intra-volume modification of biomaterials in the frame of vascularised systems, the aim of this work was to create laser-induced channels in the volume of porcine-skin gelatine hydrogel blocks. Particularly, the effect of laser parameters was investigated to optimise intra-volume channel formation in gelatine hydrogel without affecting the gelatine surface in view of next-step processing of cell-laden hydrogels. A fs laser source centred at 1030 nm wavelength was chosen to optimise the absorption of the gelatine hydrogel [24] in order to be able to work at lower pulse energies to preserve the gelatine hydrogel surface state. Laser-induced cavitation dynamics in the volume of gelatine hydrogel was here investigated with respect to the variation of two laser parameters which drive heat accumulation in the material, which is the laser repetition rate and the spatial overlap between consecutive laser pulses. The effect of other keys laser process parameters, as laser fluence, number of subsequent passes and focusing depth into the material volume was investigated in previous experiments [25].

Materials and methods

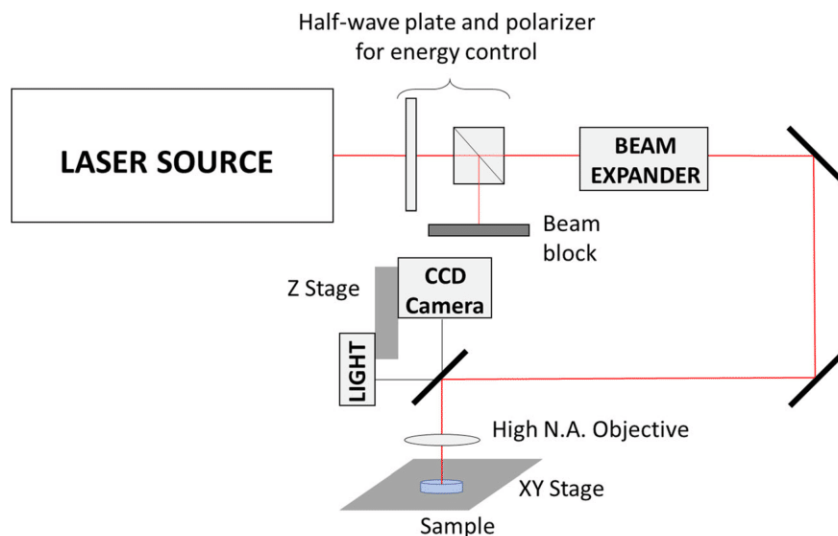
Gelatine hydrogel preparation

Gelatine hydrogel of 2% gelatine from porcine skin was prepared by adding 2 g of gelatine, type A (Sigma Aldrich), in 100 mL of distilled water. The gelatine crystals were dissolved by stirring the solution at 37 °C for 20 min on a temperature-controlled stirring system. To prepare blocks of gelatine hydrogel for micro-processing, the gel solution was poured in a 6-well culture plates, 3 mL per well and then cooled down at 4 °C overnight to complete gelation. The gelatine hydrogel was kept at 4 °C between experiments.

Laser processing setup

Laser processing of gelatine hydrogels was carried out using a 350-fs laser source (Satsuma HP³ from Amplitude Systeme) running at 1030 nm central wavelength with average power up to 40 W. The Gaussian linearly polarised laser beam was firstly sent through a couple of half-wave plate and polariser for fine adjustment of the laser pulse energy, then enlarged of a factor 3 by a beam expander before entering a 0.4 NA microscope objective (Seiwa Optical) lens to reach a theoretical focused beam diameter of about 3 μ m. The beam diameter was measured before entering the focusing optic by CCD camera WimCamD (Data Ray Inc). The samples were placed on computer-controlled XYZ translation stages

Fig. 1 Scheme of the experimental setup employed for all tests



(ALIO XY Linear Motion System and ALIO Z Precision Crossed Roller Bearing Linear Stages). Figure 1 presents a scheme of the experimental setup employed for laser processing for all tests. Straight lines were machined in the volume of gelatine hydrogels with a laser fluence of 24.54 J cm^{-2} and 5 laser passes at a depth of $100 \mu\text{m}$ from the gelatine hydrogel surface. These parameters were selected following a previous study [25]. For the tests, the repetition rate was varied in the range 10–50 kHz. The spatial overlap between successive laser pulses was varied by changing the speed of the translation stages from 0.05 to 120 mm s^{-1} . To account for possible environmental perturbation of the gelatine hydrogel overall state, for each set of laser parameters, experiments were repeated on the same day three times on three gelatine hydrogel blocks. The same experiments were then repeated on three other independent days for sake of repeatability. Nine samples for each set of process parameters were employed for characterisation.

Characterisation of laser-treated gelatine hydrogel

For each set of laser parameters, intra-volume laser-modified areas were characterised at two different moments in time: right after and 24 h after the laser processing. Right after laser processing, processed areas were imaged via a CCD camera acA2000 (Basler, field of view $535 \times 282 \mu\text{m}^2$ with 0.4 NA) whose image plane follows the laser focal point during laser interaction. The laser-modified areas were characterised 24 h later by epifluorescence microscopy. To emphasise image contrast, fluorescein was poured on the surface of the gelatine prior to observation and let sink overnight. Between the two analyses, the processed gelatine hydrogel samples were kept in a cooling environment to complete gelation at 4°C .

Rheometric analyses of gelatine hydrogel

Rheometric analyses of unprocessed gelatine hydrogel were carried out by DV3T Touch Screen Rheometer (Brookfield AMETEK). To assess time-dependant shear thinning properties, shear stress was generated using a cone-plate measuring system turning above the gelatine hydrogel surface tempered at 15°C . Viscosity measurements were carried by following a hysteresis cycle: the shear rate was increased of 5 rounds per minute (rpm) every 3 min in the range 5–20 rpm and then decreased to return to the initial value of 5 rpm. The viscosity measure was acquired before every modification of the cone-plate speed.

Results

When the fs laser light was focused by a high numerical aperture objective within gelatine hydrogel volume, cavitation bubbles quickly appeared at the interaction point. Within milliseconds from the interaction, they expanded to reach a maximum diameter and then shrank in volume, affecting the final physicochemical properties of the gelatine hydrogel. The dynamic of these cavitation bubbles could be controlled by varying several laser process parameters, which allowed monitoring the bubble formation process and evolution, as well as their number, size and shape. Twenty-four hours after laser processing, some of the largest bubbles remained trapped into the volume, while the most part completely collapsed. Firstly, from CCD images recorded right after the laser interaction, number, size, shape, placement and surface area were analysed. Secondly, voids, channels and trapped bubbles were characterised 24 h after the laser process by epifluorescence microscopy. Finally, these results were analysed with respect to the rheologic properties of the gelatine hydrogel.

The effect of laser parameter variation was taken into account by investigating the evolution of channel formation with the cumulative energy, or dose D (J cm^{-2}), absorbed by the material upon laser interaction for unit of processed surface. This parameter is here defined as follow:

$$D = \frac{N \times F}{1 - OL}$$

$$OL = 1 - \frac{v}{RR \times \phi}$$

where N is the number of successive passes, F (J cm^{-2}) the laser pulse fluence, that is energy per laser pulse E (J) divided by the focused beam spot area $\pi\Phi^2/4$ (cm^2), v (mm s^{-1}) the moving speed of the motorised stages, RR (kHz) the repetition rate of the laser and OL the spatial overlap between consecutive laser pulses. The relation between repetition rate and stage speed, which define the spatial overlap, is closely connected to heat accumulation phenomena in the material upon laser irradiations. An increase of dose, that is an increase of repetition rate for a fixed stage speed, or a decrease of stage speed for a given repetition rate, translates in higher thermal loads which the material is subjected to.

Characterisation of gelatine hydrogel right after laser interaction

Figure 2 presents representative images of cavitation bubbles recorded by CCD camera right after the interaction with the laser with respect to a variation of repetition rate and dose.

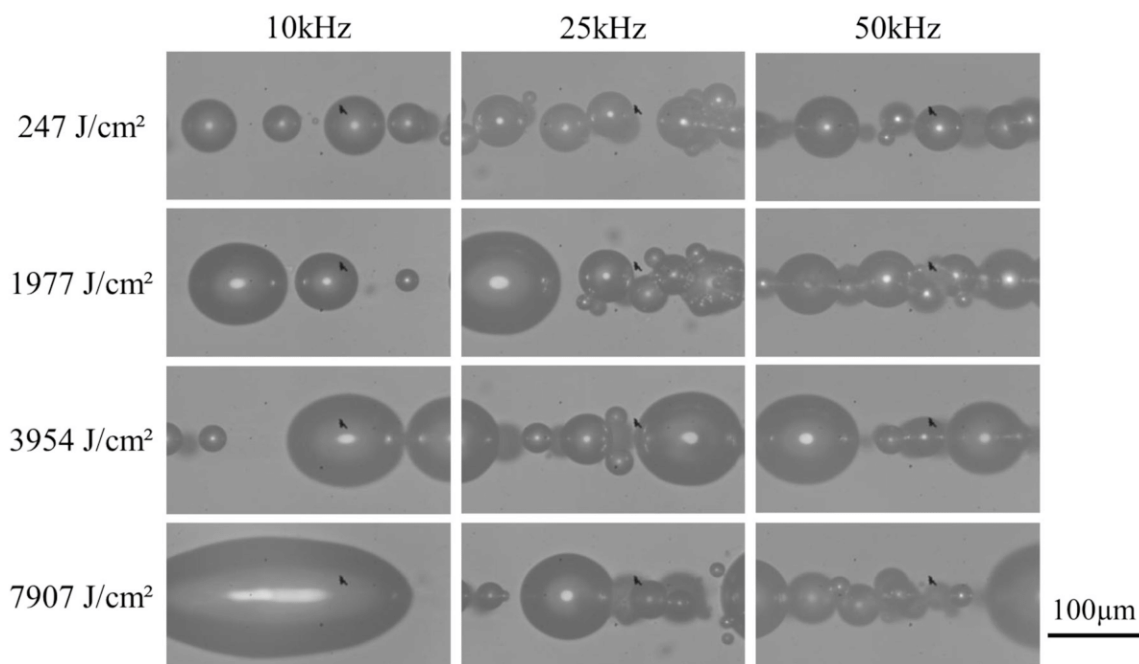


Fig. 2 CCD camera images of gelatine hydrogel right after the laser interaction for repetition rate of 10 kHz, 25 kHz and 50 kHz and dose value in the range 247–7907 J cm^{-2}

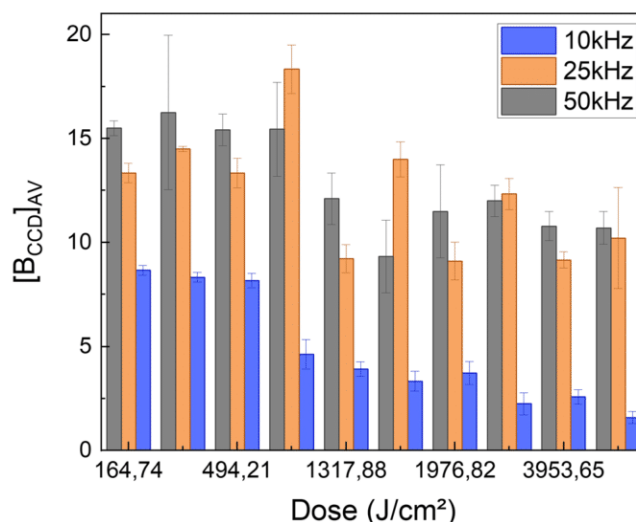


Fig. 3 Evolution of the average number of cavitation bubbles recorder right after laser interaction with respect to the dose at 10 kHz, 25 kHz, 50 kHz

Figure 3 shows the evolution of the average number of CCD recorded bubbles $[B_{\text{CCD}}]_{\text{AV}}$ with respect to the dose for the three values of repetition rate. $[B_{\text{CCD}}]_{\text{AV}}$ was calculated as the average of the number of CCD recorded bubbles obtained from the nine images recorded for each set of process parameters. Regardless the repetition rate, the same pattern of evolution of bubbles was observed qualitatively in terms of number, shape and size when the dose increased. Nevertheless, the degree of this modification varied with respect to the specific repetition rate. For all repetition rate, when the dose increased, laser-induced cavitation bubbles widened and decreased in

number. For the 10 kHz case, an average value of eight bubbles was visible at the lower dose values. As soon as the dose increased by decreasing the stage speed, only one or two massive bubbles were observed at the highest dose value. For the 25 kHz and 50 kHz cases, as the dose increased, a two-times larger number of bubbles was observable whereas only a small bubble expansion was visible. More precisely, as the width of larger bubbles increased slightly, smaller bubbles tended to implode.

A shape modification was also detected when varying the laser parameters. For high-dose value, massive cavitation bubbles were mostly non-spherical and elongated in the direction of the laser propagation axis. For lower dose values, bubbles progressively acquired a spherical shape. The transition from spherical to non-spherical shape appeared for lower dose values at low repetition rate: for instance, decreasing the dose, non-spherical bubbles were observed at dose values higher than $494\text{--}791\text{ J cm}^{-2}$, $1318\text{--}3954\text{ J cm}^{-2}$, and $3954\text{--}7907\text{ J cm}^{-2}$ for 10, 25, and 50 kHz, respectively.

The most important effect on the cavitation bubble dynamics observed for the different repetition rates was the capacity of bubbles to form agglomerates and the presence of a trail in the direction of the laser propagation axis (Fig. 4a). An agglomerate is here defined as the accumulation of 6 or more bubbles together (Fig. 4b). At 10 kHz, no agglomerates were visible in the processed regions: the distance between nearby bubbles decreased slightly as the dose increased. Nevertheless, a trail in the direction of propagation of the laser beam was well visible for all dose values. This trail might be connected to a modification of the material which did not result in cavitation bubble formation. At 25 kHz and 50 kHz, agglomerates appeared already at the lower dose values, and therefore, no trails were visible at these repetition rates.

Regardless of the dose, these results highlighted a different regime of interaction which drove the cavitation bubble dynamics at 10 kHz with respect to the other investigated repetition rates. In order to better understand the physical mechanisms taking place during the laser-gelatine hydrogel interaction, the average normalised bubble-covered surface was retrieved with the following

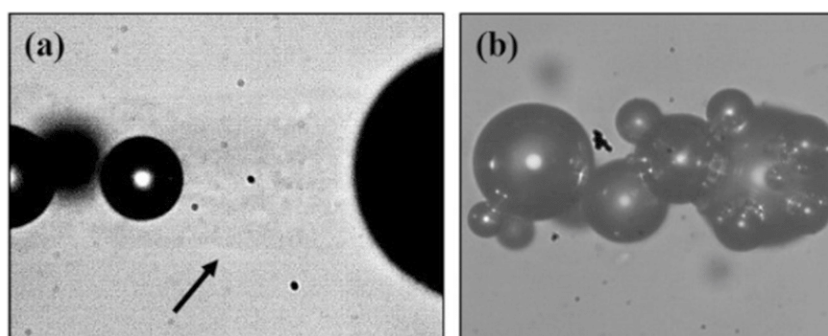
procedure: for each set of process parameters, 9 CCD images were obtained. For each CCD image, the bubble-covered surface S_{CCD} was calculated by ImageJ software and then normalised with respect to the number of bubbles B_{CCD} . The average normalised bubble-covered surface $[S_{\text{CCD}}/B_{\text{CCD}}]_{\text{AV}}$ was obtained as the average of the 9 normalised bubble-covered surface $S_{\text{CCD}}/B_{\text{CCD}}$ obtained from each CCD image. The evolution of the normalised bubble-covered surface with respect to the dose for all three repetition rates is presented in Fig. 5. Up to a dose value of 494 J cm^{-2} , no significant variations were observed for all repetition rates. After this value, an important increase was observed at 10 kHz while only a negligible variation was observed at 25 kHz and 50 kHz.

Characterisation of gelatine hydrogel 24 h after laser interaction

The same laser-processed regions were analysed 24 h after the laser interaction by epifluorescence microscopy. Figure 6 presents images of the laser-gelatine hydrogel interaction regions. Three main features were visible around the interaction region: (i) the so-called heat-affected zone (HAZ), which was modifications of the gelatine hydrogel structure along the laser path connected to diffusion of the thermal loads induced by the laser irradiation; (ii) solidified bubbles which did not completely shrink after expansion, in bright green; and (iii) voids or intra-volume channels, which appeared in black in fluorescence images.

For each set of process parameters, the evolution of the average laser-modified surface $[S_{\text{MOD}}]_{\text{AV}}$ with the dose is plotted in Fig. 7. The laser-modified surface S_{MOD} was obtained from Image J software analyses of epifluorescence microscopy images as the ensemble of the three features detailed above. The average laser-modified surface $[S_{\text{MOD}}]_{\text{AV}}$ was calculated as the average of laser-modified surface obtained from each of the nine images recorded for each set of process parameters. Figure 8 presents the evolution of the average number of solidified bubbles $[B_{\text{SOL}}]_{\text{AV}}$ with the dose. $[B_{\text{SOL}}]_{\text{AV}}$ was calculated as the average of the number of solidified

Fig. 4 CCD camera images of **a** a representative trail visible after the laser interaction, indicated by the black arrow, and **b** representative agglomerate of 6 or more small cavitation bubbles



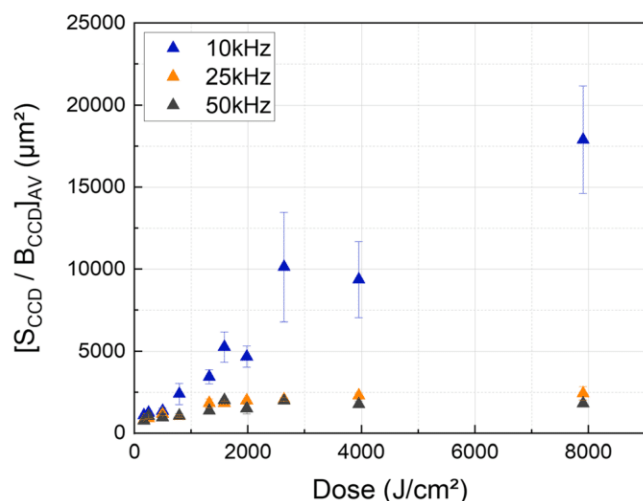


Fig. 5 Evolution of the normalised bubble-covered surface with respect to the dose for repetition rate of 10 kHz, 25 kHz and 50 kHz

bubbles obtained from the nine images obtained for each set of process parameters. Surprisingly, for all repetition rates, a decrease of the average laser-modified surface was observed as the dose increased, the lowest values being for the 10 kHz case. When the dose increased, the average number of solidified bubbles also increased at 10 kHz, while it remained approximately constant at 25 kHz and decreased at 50 kHz. Finally, as a general behaviour, for a repetition rate of 10 kHz, larger solidified bubbles were visible with respect to higher repetition rates as the dose increased. On the other hand, at 25 kHz and 50 kHz, the HAZ had a more irregular aspect.

Table 1 summarises the observations on the HAZ aspect and on the presence of voids or intra-volume channels for all set of laser parameters. With respect to the

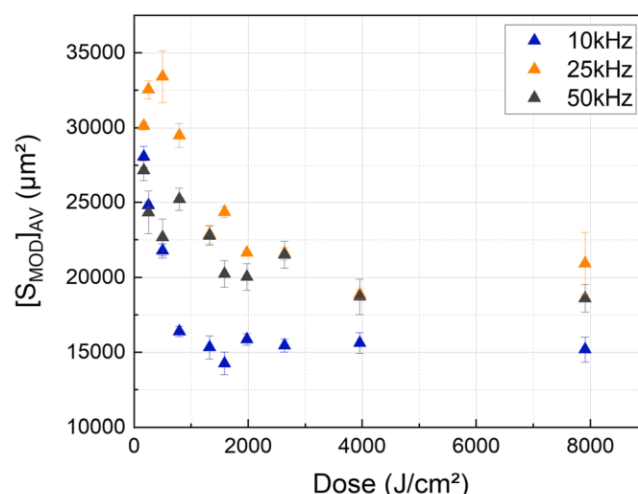


Fig. 7 Evolution of the average laser-modified surface with the dose for repetition rate of 10 kHz, 25 kHz and 50 kHz

HAZ, its appearance was labelled as U, W and I in connection to a uniform, wavy and irregular aspect, respectively. The colour-coded classification for voids or intra-volume channels was based on the following observations:

- *Green*: generation of a continuous or discontinuous channel into the volume of the gelatine (e.g. Fig. 6 at 10 kHz and 7907 J cm⁻²).
- *Yellow*: several discontinuous voids were detected but no proper channel was formed along the laser propagation axis (e.g. Fig. 6 at 25 kHz and 3954 J cm⁻²).
- *Red*: only slight modifications of gelatine were observed, no fully formed voids were detected (e.g. Fig. 6 at 25 kHz and 247 J cm⁻²).

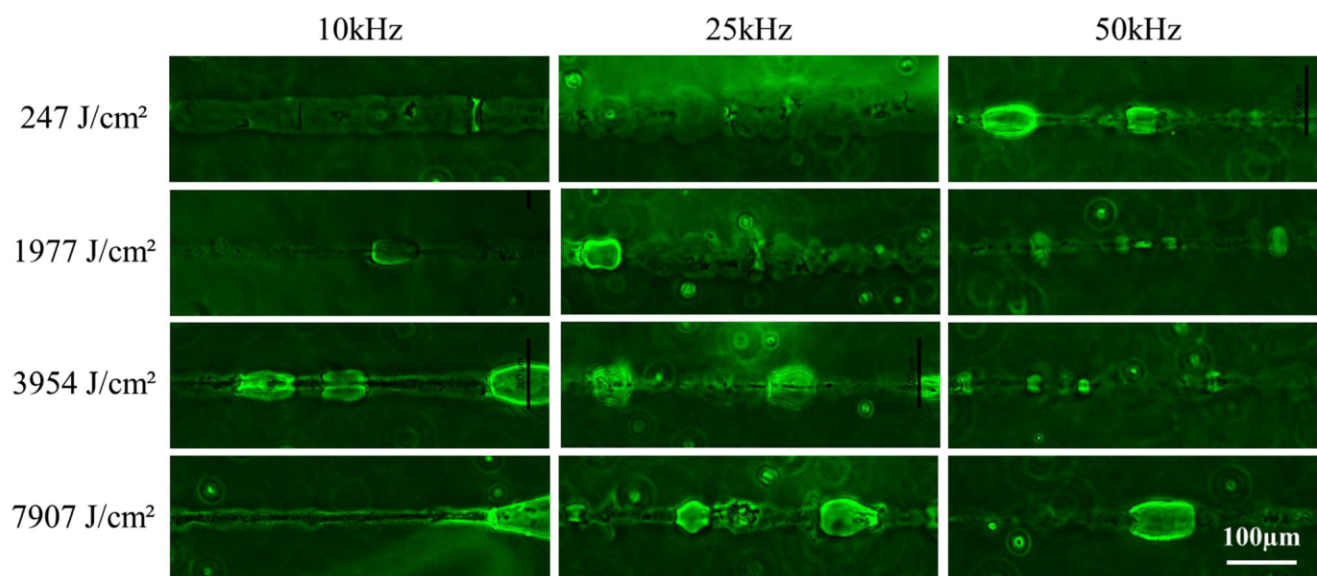


Fig. 6 Representative images recorded by epifluorescence microscopy of the laser-processed gelatine hydrogel regions for repetition rate of 10 kHz, 25 kHz and 50 kHz and dose value in the range 247–7907 J cm⁻²

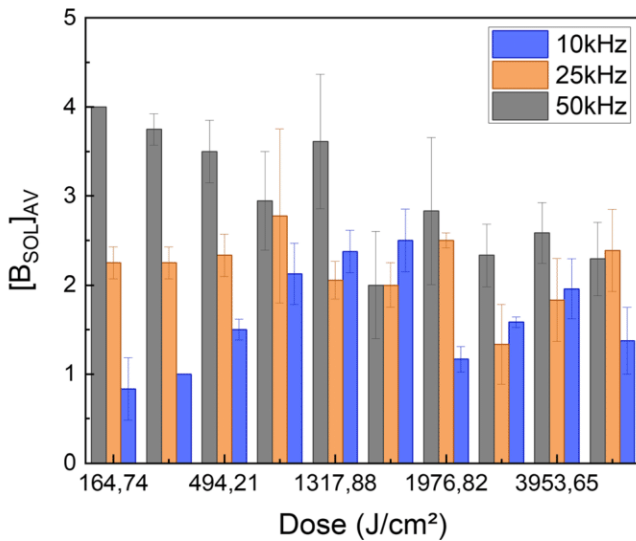


Fig. 8 Evolution of average number of solidified bubbles recorded 24 h after the laser interaction for each set of process parameters with the dose for repetition rate of 10 kHz, 25 kHz and 50 kHz

For each set of process parameters, nine images were analysed. A colour-coded classification for voids or intra-volume channel appearance and a letter defining the quality of the HAZ were attributed at each image. For both

characteristic, the resulting one representing the majority was assigned to the set of process parameters.

At 10 kHz, for dose values below 247 J cm^{-2} , no proper channel was detected, and only mild modifications of the material could be observed. Increasing the dose, discontinuous voids increased in number and appeared inside the volume along the laser propagation axis. Although discontinuous channels started to appear already at dose value of 1318 J cm^{-2} , the formation of a properly fully formed channel was visible for higher dose above 2636 J cm^{-2} . At 25 kHz and the highest value of dose, fully formed channels were visible only in the 57% of the cases. Finally, for a repetition rate of 50 kHz, intra-volume channels were formed at low-dose values in 50% of the analyses cases.

Characterisation of gelatine hydrogel rheological properties

Analyses of the rheological properties of the gelatine hydrogel allowed understanding the degradation and deformation mechanisms taking place into gelatine hydrogels when given external forces were applied. Figure 9 presents the evolution of the gelatine hydrogel viscosity in time when shear stress was induced in the material. Under shear stress, the gelatine

Table 1 Summary of the observations on the HAZ aspect and on the presence of voids or intra-volume channels for all set of laser parameters

OL	Dose (J.cm ⁻²)	10kHz		25kHz		50kHz	
		HAZ	Channel	HAZ	Channel	HAZ	Channel
26%	165	U		W		W	
50%	247						
75%	494	W		I		I	
84%	791						
91%	1318			W		W	
92%	1581						
94%	1977	U		I		W	
95%	2636						
97%	3954			I		W	
98%	7907						

The colour-coded classification for voids or intra-volume channels is green when a fully-formed channel was visible, yellow when several discontinuous voids were detected and red when no voids were observed. The HAZ was distinguished in U, W and I when it was characterised by a uniform, wavy or irregular aspect, respectively

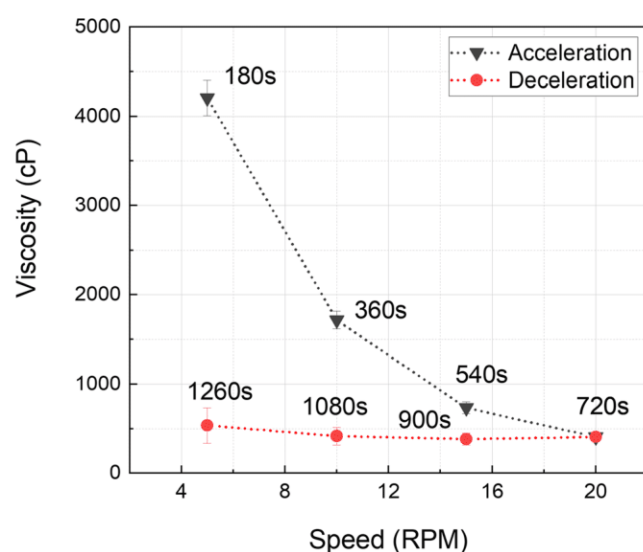


Fig. 9 Evolution of unprocessed gelatine hydrogel viscosity with respect to the stirring speed recorded by following an hysteresis cycle during rheometric analyses: the shear rate was increased of 5 rounds per minute (rpm) every 3 min in the range 5–20 rpm and then decreased to return to the initial value of 5 rpm. The viscosity measure was acquired before every modification of the cone-plate speed

hydrogel viscosity dropped drastically and continued to decrease when the shear stress load increased (acceleration curve). It is important to highlight that as soon as these shear stresses were reduced, the viscosity of the gelatine hydrogel did not return to its initial value; this characteristic makes the gelatine hydrogel a thixotropic material: its viscosity is time-dependant and fluidifies also under constant shear stress.

Discussion

This work aims to identify certain sets of laser parameters allowing the creation of a fully-formed channel within gelatine hydrogel blocks without impacting the material surface. The discussion of the results presented above is here focused on the combination of possible phenomena leading to the formation of a fully formed channel.

For the sake of clarity, Fig. 10 presents results already shown in Figs. 3 and 8 and here sorted according to each separate repetition rate. The red region highlighted in the graph at 10 kHz highlights the group of sets of process parameters for which fully formed channels are found. The generation of fully formed channels takes place when approximately the same number of cavitation bubbles generated upon laser interaction and observed right after the laser interaction are also found solidified 24 h after. This observation could help gain an insight on the physical phenomena resulting in the formation of a fully formed intra-volume channels. According to literature, when irradiated with fs laser, high water content materials such as hydrogels undergo

degradation primarily through bubble cavitation rather than ionisation of polymeric chains [23]. Upon absorption of the laser energy in a confined volume of gelatine hydrogel, a highly localised pressure gradient is generated and cavitation bubbles filled by vapour are formed. These bubbles expand with a specific dynamic into the surrounding untreated gelatine hydrogel inducing mechanical stresses and shock waves which results in modification of the material nature [13, 26–31]. Because of the stiffness of the material, a certain resistance against bubble expansion, resulting in elastic restoring forces, also has to be accounted for. Once the pressure gradient disappears, the cavitation bubble could collapse or, when its dimension is large enough, shrink back through an implosive mechanism [32, 33], remaining trapped and solidified into the material once the latter returns to its initial state. In these dynamics, the formation of a fully formed channel might be connected to the shrinking process of large bubbles, being slow enough to results in their solidification. Smaller cavitation bubbles might be connected to a quicker expansion-collapse dynamic which prevents the formation of proper channels.

The formation of a low number of non-spherical large cavitation bubbles at 10 kHz and dose higher than 2636 J cm^{-2} is attributed to the merging of smaller bubbles. This merging mechanism cannot take place at higher repetition rates when the successive laser pulse arrives too early to allow the small cavitation bubbles to merge. A higher number of smaller bubbles, which later become agglomerates, are observed instead.

Information about the influence of the repetition rate on channel formation can be retrieved also by comparing the average laser-modified surface (Fig. 7) with the average number of solidified bubbles and the presence of a fully-formed channel presented in Fig. 10 and Table 1, respectively. Regardless of the repetition rate, the average laser-modified surface decreases with the increase of the dose. A very different behaviour is observed at 10 kHz, 25 kHz and 50 kHz with respect to the average number of solidified bubbles observed 24 h after the laser process. At 10 kHz, an overall increase of the average number of solidified bubbles and of the appearance of voids and fully formed channels is observed when the dose increases and the HAZ is limited to a region of a few μm surrounding the channels as observed in the analyses of epifluorescence microscopy images (Fig. 6). At 50 kHz, the opposite behaviour appears: as the dose increases, the average laser-modified surface decreases together with the average number of solidified bubbles and the appearances of voids. The HAZ is larger and constitutes the most part of the laser-modified surface. At 25 kHz, the average number of solidified bubbles does not change visibly while no voids or channels are detected. These observations validated the hypothesis that at low repetition rate, most of the absorbed laser energy is dispersed in formation of large bubbles rather than into the material surroundings.

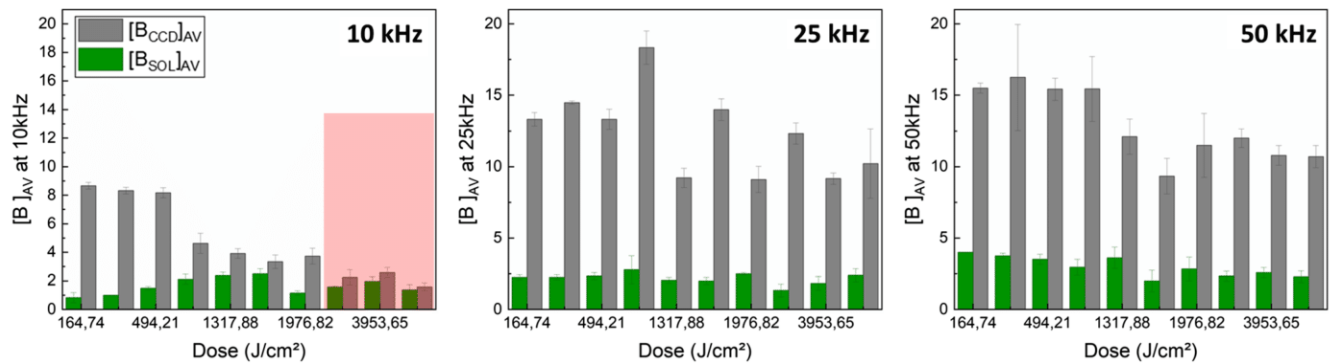


Fig. 10 Results presented in Figs. 3 and 8 sorted with respect to the specific repetition rate: average number of cavitation bubbles recorded right after laser interaction and average number of solidified bubbles

recorded 24 h after the laser interaction for 10 kHz (left-hand image), 25 kHz (central image) and 50 kHz (right-hand image)

Rheology studies have shown that gelatine hydrogel viscosity decreases under mechanical stress and presents a memory effect for which it remains at lower values once the mechanical load is removed. These time-dependant and shear thinning properties of the gelatine hydrogel might explain the behaviour of such material upon laser irradiation: if after single-pulse or low-overlap laser irradiation, the gelatine hydrogel might recover to its initial state, at higher repetition rate and high overlap between consecutive laser pulses, the gelatine hydrogel viscosity does not return to its initial values and the interaction is driven from thermal loads (formation of small cavitation bubbles and presence of a large HAZ) rather than mechanical processes (formation of large cavitation bubbles which solidify).

Conclusion

In conclusion, intra-volume fully formed channels were generated by laser processing by employing a laser source running at 1030 nm wavelength and 350 fs pulse duration tightly focused by a high numerical aperture objective. The influence of the laser repetition rate and the dose was investigated to gain a deeper insight into the physical mechanism driving the formation of channels. The role of thermal loads and mechanical processes following the ultra-fast laser interaction was highlighted and supported by rheology analyses. The formation of fully formed channels was to attribute to the formation of large non-spherical cavitation bubbles which arose at high dose and low repetition rates (≤ 10 kHz). In these conditions, analyses of epifluorescence microscopy images showed the appearance of voids and fully formed channels while the HAZ was limited to a region of a few μm surrounding the channels. At higher repetition rates, the thermal loads induced in the gelatine hydrogel were too important and were dissipated to form irregular HAZ patterns rather than well-defined cavitation bubbles. A higher number of smaller bubbles which tend to agglomerate were observed in this case.

Further experiments are foreseen employing cell-covered gelatine hydrogel blocks in order to investigate the viability of cells upon laser interaction.

Acknowledgements The authors would like to thank Dr. Béatrice L’Azou and Dr. Gilles Lemagnen (LTPIB laboratory, associated Professor at Bordeaux University) for support with the rheology analyses and the interesting discussions.

Funding information The French National Association of Research and Technology (Grant no2017/0579) provided support and funding.

Data availability The authors confirm that the data supporting the findings of this study are available within the article.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Novosel EC, Kleinhans C, Kluger PJ (2011) Vascularization is the key challenge in tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev*
- Yuksel E, Choo J, Wettergreen M, Liebschner M (2005) Challenges in soft tissue engineering. *Semin Plast Surg* 19:261–270. <https://doi.org/10.1055/s-2005-919721>
- Ruprecht V, Monzo P, Ravasio A et al (2017) How cells respond to environmental cues - insights from bio-functionalized substrates. *J Cell Sci* 130:51–61. <https://doi.org/10.1242/jcs.196162>
- Lapointe VLS, Fernandes AT, Bell NC et al (2013) Nanoscale topography and chemistry affect embryonic stem cell self-renewal and early differentiation. *Adv Healthc Mater* 2:1644–1650. <https://doi.org/10.1002/adhm.201200382>
- Mandal BB, Kundu SC (2009) Cell proliferation and migration in silk fibroin 3D scaffolds. *Biomaterials* 30:2956–2965. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.02.006>
- Rose JB, Pacelli S, El Haj AJ et al (2014) Gelatin-based materials in ocular tissue engineering. *Materials (Basel)* 7:3106–3135. <https://doi.org/10.3390/ma7043106>
- Hoque M, Nuge T, Yeow T et al (2015) Gelatin based scaffolds for tissue engineering-a review. *Polym Res J* 9:15

8. Parenteau-Bareil R, Gauvin R, Berthod F (2010) Collagen-based biomaterials for tissue engineering applications. *Materials (Basel)* 3:1863–1887. <https://doi.org/10.3390/ma3031863>
9. Ozbolat IT (2015) Bioprinting scale-up tissue and organ constructs for transplantation. *Trends Biotechnol* 33:395–400. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.04.005>
10. Murphy SV, Atala A (2014) 3D bioprinting of tissues and organs. *Nat Biotechnol* 32:773–785. <https://doi.org/10.1038/nbt.2958>
11. Bajaj P, Schweller RM, Khademhosseini A et al (2014) 3D biofabrication strategies for tissue engineering and regenerative medicine. *Annu Rev Biomed Eng* 16:247–276. <https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-071813-105155>
12. Lubatschowski H, Maatz G, Heisterkamp A et al (2000) Application of ultrashort laser pulses for intrastromal refractive surgery. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 238:33–39. <https://doi.org/10.1007/s004170050006>
13. Vogel A, Noack J, Hüttman G, Paltauf G (2005) Mechanisms of femtosecond laser nanosurgery of cells and tissues. *Appl. Phys. B Lasers Opt*
14. Applegate MB, Coburn J, Partlow BP et al (2015) Laser-based three-dimensional multiscale micropatterning of biocompatible hydrogels for customized tissue engineering scaffolds. *Proc Natl Acad Sci*. <https://doi.org/10.1073/pnas.1509405112>
15. Hribar KC, Meggs K, Liu J et al (2015) Three-dimensional direct cell patterning in collagen hydrogels with near-infrared femtosecond laser. *Sci Rep*. <https://doi.org/10.1038/srep17203>
16. Smith NI, Fujita K, Nakamura O, Kawata S (2001) Three-dimensional subsurface microprocessing of collagen by ultrashort laser pulses. *Appl Phys Lett*. <https://doi.org/10.1063/1.1347392>
17. Gattass RR, Mazur E (2008) Femtosecond laser micromachining in transparent materials. *Nat Photonics* 2:219–225. <https://doi.org/10.1038/nphoton.2008.48>
18. Itoh K, Watanabe W, Nolte S, Schaffer CB (2006) Ultrafast processes for bulk modification of transparent materials. *MRS Bull* 31: 620–625. <https://doi.org/10.1557/mrs2006.159>
19. Hemmer E, Benayas A, Légaré F, Vetrone F (2016) Exploiting the biological windows: current perspectives on fluorescent bioprobes emitting above 1000 nm. *Nanoscale Horizons* 1:168–184. <https://doi.org/10.1039/c5nh00073d>
20. Oujja M, Pérez S, Fadeeva E et al (2009) Three dimensional microstructuring of biopolymers by femtosecond laser irradiation. *Appl Phys Lett* 95. <https://doi.org/10.1063/1.3274127>
21. Gaspard S, Forster M, Huber C et al (2008) Femtosecond laser processing of biopolymers at high repetition rate. *Phys Chem Chem Phys* 10:6174–6181. <https://doi.org/10.1039/b807870j>
22. Gaspard S, Oujja M, Abrusci C et al (2008) Laser induced foaming and chemical modifications of gelatine films. *J Photochem Photobiol A Chem* 193:187–192. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2007.06.024>
23. Pradhan DS, Keller KA, Sperduto SJH (2017) Fundamentals of laser-based hydrogel degradation and applications in cell and tissue engineering. *Adv Healthc Mater*. <https://doi.org/10.1002/adhm.201700681>
24. Taroni P, Bassi A, Comelli D et al (2009) Diffuse optical spectroscopy of breast tissue extended to 1100 nm. *J Biomed Opt* 14: 054030. <https://doi.org/10.1117/1.3251051>
25. Verit I, RIGOTHIER C, GEMINI L, et al (2019) Biofabrication of a vascular capillary by ultra-short laser pulses
26. Vogel A, Noack J, Nahen K et al (1999) Energy balance of optical breakdown in water at nanosecond to femtosecond time scales. *Appl Phys B Lasers Opt* 68:271–280. <https://doi.org/10.1007/s003400050617>
27. Vogel A, Venugopalan V (2003) Mechanisms of pulsed laser ablation of biological tissues. *Chem Rev*. <https://doi.org/10.1021/cr010379n>
28. Linz N, Freidank S, Liang XX, Vogel A (2016) Wavelength dependence of femtosecond laser-induced breakdown in water and implications for laser surgery. *Phys Rev B*. <https://doi.org/10.1103/PhysRevB.94.024113>
29. Juhasz T, Kastis GA, Suárez C et al (1996) Time-resolved observations of shock waves and cavitation bubbles generated by femtosecond laser pulses in corneal tissue and water. *Lasers Surg Med* 19:23–31. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9101\(1996\)19:1<23::AID-LSM4>3.3.CO;2-2](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9101(1996)19:1<23::AID-LSM4>3.3.CO;2-2)
30. Loesel FH, Niemz MH, Bille JF, Juhasz T (1996) Laser-induced optical breakdown on hard and soft tissues and its dependence on the pulse duration: experiment and model. *IEEE J Quantum Electron*. <https://doi.org/10.1109/3.538774>
31. Centrale É, Université DL, Bernard C (2015) Caractérisation optique et acoustique d'une bulle générée par focalisation laser Résumé : Abstract
32. Kang W, Raphael M (2018) Acceleration-induced pressure gradients and cavitation in soft biomaterials. *Sci Rep* 8:2–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-34085-4>
33. Kang W, Adnan A, O'Shaughnessy T, Bagchi A (2018) Cavitation nucleation in gelatin: experiment and mechanism. *Acta Biomater* 67:295–306. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.11.030>

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

II.3. Discussion

Cet article propose d'analyser l'influence de la cadence laser et du taux de recouvrement entre deux impulsions successives sur la formation d'un canal intravolumique et sur les dégâts créés autour de la zone irradiée lors de l'usinage laser. Ces deux paramètres permettent de moduler directement l'accumulation thermique en jouant sur la dose énergétique absorbée par unité de surface au sein du volume focal.

II.3.1. Mécanismes de formation des canaux et de dégradation de la gélatine

L'obtention d'un canal intravolumique 24 heures après la fin de l'usinage semble corrélée avec la présence de bulles de cavitation volumineuses, non sphériques et peu nombreuses formées pendant l'usinage. De telles bulles sont observées uniquement pour un faible taux de répétition (≤ 10 kHz) avec une dose énergétique élevée ($\geq 2636 \text{ J.cm}^{-2}$). Elles résultent de la fusion de plusieurs petites bulles de cavitation sphériques. Après fusion des petites bulles, la bulle volumineuse ainsi formée atteint sa taille maximale en quelques secondes puis entame ensuite sa phase de décroissance. Sa vitesse de décroissance est alors bien plus lente que celles des plus petites bulles et, au lieu de disparaître complètement, la bulle se retrouve finalement piégée une fois la gélatine complètement refroidie et de nouveau gélifiée. La formation d'un canal régulier à l'intérieur de l'hydrogel serait ainsi liée au lent rétrécissement des bulles volumineuses jusqu'à leur solidification pour une cadence de 10 kHz et un taux de recouvrement élevé ($\geq 95 \%$). Ces hypothèses sont appuyées par la littérature selon laquelle les matériaux riches en eau se dégraderaient sous l'action d'un laser femtoseconde principalement par un processus mécanique de cavitation plutôt que par l'ionisation des liaisons chimiques de la chaîne polymérique [124]. Pour ces paramètres laser, le canal formé est entouré d'une zone affectée thermiquement étroite et limitée à seulement quelques μm autour du canal. Ce résultat suggère que pour un faible taux de répétition laser (10 kHz), l'énergie laser est majoritairement absorbée et convertie en énergie mécanique de cavitation responsable de la formation d'un canal plutôt que dispersée sous forme d'énergie thermique.

Pour une cadence plus élevée (25 kHz ou 50 kHz), les impulsions lasers successives sont trop rapprochées temporellement les unes des autres pour permettre la fusion des petites bulles de cavitation. A la place, on peut observer un agglomérat de petites bulles sphériques dont les vitesses d'expansion et de décroissance sont nettement plus rapides que celles pour 10 kHz. Cette capacité à rétrécir en quelques secondes leur permettent de disparaître totalement en moins d'une minute. Cette disparition pourrait empêcher la formation du canal. Pour ces cadences plus élevées, la zone affectée thermiquement s'étend de façon irrégulière sur plusieurs dizaines de μm autour de la zone irradiée. Cette fois-ci, l'énergie laser est

majoritairement dispersée sous forme d'énergie thermique responsable de la déformation de la gélatine plutôt que convertie en énergie mécanique responsable de la formation du canal.

II.3.2. Propriétés rhéologiques de l'hydrogel de gélatine

La mesure rhéologique de l'hydrogel de gélatine a permis de mettre en évidence un comportement non Newtonien de l'hydrogel avec des propriétés thixotropiques. Cela signifie que la viscosité dynamique de la gélatine évolue de façon non linéaire lors de l'application d'une contrainte en dépendant également du temps d'application de la contrainte. Ainsi, sous l'action d'un stress mécanique, comme par exemple l'expansion d'une bulle de cavitation, la viscosité de l'hydrogel diminue et reste maintenue à de faibles valeurs même lorsque la charge mécanique est diminuée ou arrêtée. Ce comportement peut expliquer la différence de mécanisme de dégradation pour une cadence de 10 kHz ou une cadence laser plus importante.

Effectivement, après une seule impulsion laser ou plusieurs impulsions se suivant à faible cadence, la gélatine pourrait retourner dans son état initial, alors que pour des taux de répétition plus élevés, la gélatine n'a pas le temps de retrouver un état stable et est dégradée majoritairement via des processus thermiques plutôt que des processus mécaniques.

II.4. Conclusion

Ces résultats montrent que l'obtention de canaux réguliers avec peu d'irrégularités est possible en diminuant l'accumulation thermique au point focal laser. Les canaux obtenus à une profondeur de 100 μm ont été réalisés avec une cadence de 10 kHz et un taux de recouvrement entre deux impulsions successives dans la plage [95 % – 98 %] associés à une vitesse de déplacement des platines appartenant à une gamme entre [1,5 mm/s et 0,5 mm/s] respectivement et une valeur de la dose entre [2636 J.cm⁻² et 7907 J.cm⁻²]. Par rapport à la première étude, les usinages sont réalisés avec un taux de recouvrement plus faible (> 99 % auparavant) et une cadence également diminuée (50 kHz précédemment). Ces paramètres permettent de diminuer la dose énergétique déposée au point focal laser et de favoriser la conversion de l'énergie laser en énergie de cavitation plutôt que de la disperser dans le matériau environnant sous forme de dégâts thermiques. La zone affectée thermiquement autour du canal est alors réduite à quelques μm avec peu d'irrégularités (ou cracs) contrairement à la première étude.

III. Conclusion des deux articles

L'objectif commun de ces deux publications est de déterminer une fenêtre étroite de paramètres lasers pour usiner des canaux intravolumiques dans un hydrogel et la compréhension des mécanismes de dégradation de l'hydrogel afin de pouvoir adapter les conditions d'usinage aux microfibres en limitant le nombre d'échantillon utilisé.

Concernant le premier objectif, l'obtention d'un canal régulier peut être obtenue avec une faible profondeur de focalisation ($D \leq 100 \mu\text{m}$), un faible nombre de passages laser ($N \leq 5$) et une fluence supérieure au seuil de formation de cavités ($F \geq 18,35 \text{ J.cm}^{-2}$). Pour diminuer la zone thermiquement affectée autour du canal formé, l'accumulation thermique sera réduite en optant pour une cadence de **10 kHz** et un taux de recouvrement entre deux impulsions successives idéalement situé dans la fourchette [**95 % - 98 %**]. Pour obtenir de telles valeurs de recouvrement à 10 kHz avec un spot laser d'environ **3 μm** de diamètre, la vitesse de déplacement des platines pourra être variée entre [**0,5 mm/s - 1,5 mm/s**].

Concernant le second objectif, il semblerait que la formation d'un canal à l'intérieur d'un matériau riche en eau comme un hydrogel peut avoir lieu lorsque l'énergie laser est majoritairement absorbée et convertie en énergie mécanique de cavitation plutôt que dispersée sous de chaleur. L'absorption de l'énergie laser conduit alors à la formation de bulles non sphériques, peu nombreuses et volumineuses qui mettent plusieurs heures à disparaître. Ce mécanisme de dégradation permet d'obtenir un usinage propre dont la zone affectée thermiquement est réduite à seulement quelques μm autour de la zone irradiée.

A la lumière de ces résultats, on peut maintenant établir une fenêtre de paramètres lasers sur laquelle baser nos premières expérimentations sur microfibres. Pour rappel, une microfibre cellulaire est un modèle de capillaire tridimensionnel non perfusable de forme cylindrique dont le diamètre moyen externe est de 200 μm environ. La couche externe de ce cylindre est recouverte d'une double couche de cellules. La géométrie cylindrique peut induire des aberrations sphériques pouvant accroître la dispersion du faisceau laser et diminuer les phénomènes d'absorption multiphotonique au niveau du point focal. La présence d'une couche externe de cellules doit être pris en compte lors du réglage paramétrique afin de préserver leur viabilité.

Pour réaliser une lumière interne dans les microfibres glomérulaires, on privilégiera les paramètres menant à la formation de plus larges bulles avec une vitesse de décroissance très lente déterminée selon l'étude précédente.

Profondeur de focalisation (D) :

L'étude de la profondeur de focalisation à l'intérieur des microfibres a montré qu'il était tout à fait envisageable de réaliser un tir laser avec une profondeur de **100 μm** pour réaliser un canal au centre des microfibres de 200 μm de diamètre. La profondeur de tir pourra être légèrement diminuée si l'absorption parasite de l'énergie laser par la couche cellulaire est trop importante.

Fluence laser (F) :

La fluence choisie sera maintenue à **$F = 24,54 \text{ J.cm}^{-2}$** , ce qui correspond une fluence légèrement supérieure à la fluence minimale requise pour observer la formation d'un canal dans le collagène pour une profondeur de 100 μm . Cette fluence correspond à une énergie de **2 μJ** par impulsion pour un spot laser d'environ **3 μm** de diamètre.

Nombre de passages laser (N) :

Afin de préserver la viabilité cellulaire, **un seul passage** laser sera effectué à l'intérieur d'une fibre. Le nombre de passages laser pourra toutefois être augmenté si jamais les caractéristiques des bulles formées après un seul passage ne sont pas satisfaisantes (décroissance trop rapide ou taille de bulles trop petite). Le nombre de passages laser ne devra cependant pas dépasser la valeur $N = 5$ afin de préserver la viabilité cellulaire.

Taux de répétition laser (RR) :

Le taux de répétition laser sera maintenue majoritairement à **$RR = 10 \text{ kHz}$** . Des essais à 50 kHz seront tout de même conduits pour vérifier la cohérence des résultats entre les blocs de gélatine et les fibres de collagène.

Taux de recouvrement entre deux impulsions (OL) :

La variation du taux de recouvrement à une cadence fixe se fait en faisant varier la vitesse de déplacement des platines de translation XY. Il semblerait qu'un taux de recouvrement supérieure à 95 % soit nécessaire pour obtenir un canal dans plus de 50 % des essais d'usinage. Cependant, la formation d'un canal semble très aléatoire dans la plage de recouvrement [90 – 99] %. L'influence du recouvrement sera donc étudiée directement sur fibres et pourra être un paramètre d'ajustement de l'accumulation thermique pour préserver au mieux la viabilité cellulaire. Pour une cadence de 10 kHz, un taux de recouvrement variant entre **90 %** et **99 %** correspond à une vitesse de déplacement des platines oscillant entre **3 mm/s** et **0,5 mm/s** respectivement.

L'influence de paramètres extérieurs au laser comme les conditions de manipulation, de conservation et d'hydratation des fibres, la durée de l'usinage, le transport des échantillons ou

la température seront également étudiés et discutés dans le chapitre suivant dans le but d'améliorer la viabilité cellulaire.

CHAPITRE IV.

Micro-usinage d'un hydrogel de collagène à l'intérieur de microfibres cellularisées par laser femtoseconde

Ce dernier chapitre présente les résultats expérimentaux obtenus lors de l'usinage des microfibres. L'usinage laser consiste ici, à créer un canal dans le cœur des fibres constitué d'hydrogel de collagène avec un laser ultracourt et une longueur d'onde de 1030 nm. En utilisant un objectif d'ouverture numérique de 0,4, le faisceau laser est focalisé derrière la couche externe cellulaire dans le volume de collagène. Ce chapitre se focalise sur l'optimisation de l'usinage laser en s'inspirant des résultats précédents réalisés à l'intérieur des blocs de gélatine. La première partie présentent les résultats préliminaires réalisés sur les microfibres qui permettent d'évaluer les difficultés et spécificités de l'usinage. La seconde partie étudie l'influence de cinq paramètres lasers sur l'usinage : la profondeur du point focal (D), la fluence (F), le nombre de passage laser (N), la cadence (RR) et le taux de recouvrement (OL). Pour chacun de ces paramètres, le comportement des bulles de cavitation formées, la présence ou l'absence d'un canal et la viabilité des cellules après usinage seront analysés puis discutés. Enfin la dernière partie se consacre à l'étude des paramètres extérieurs aux lasers sur l'usinage tel que l'épaisseur des fibres et la quantité d'hydratation.

I. Travaux préliminaires

I.1. Création d'un canal sur fibres fixées au PFA 4 %

Des travaux préliminaires à ma thèse ont démontré la faisabilité de créer un canal à l'intérieur des microfibres par usinage laser. Ces travaux ont été fait sur des fibres non vivantes, préalablement fixées au PFA 4 %, avec un laser d'une durée d'impulsion de 370 fs, d'une longueur d'onde de 1060 nm et focalisé avec un objectif d'ouverture numérique de 0,4. Cette étude a montré qu'il était possible de réaliser une lumière interne pour une cadence de 50 kHz et une énergie par impulsion de 3 μ J. La largeur de la lumière obtenue à l'intérieur du collagène variait entre 8 et 14 μ m. La Figure 51 présente la lumière centrale créée par usinage laser dans le collagène (en vert) à l'intérieur d'une microfibre fixée. Les cellules fixées apparaissent en bleu après un marquage DAPI.

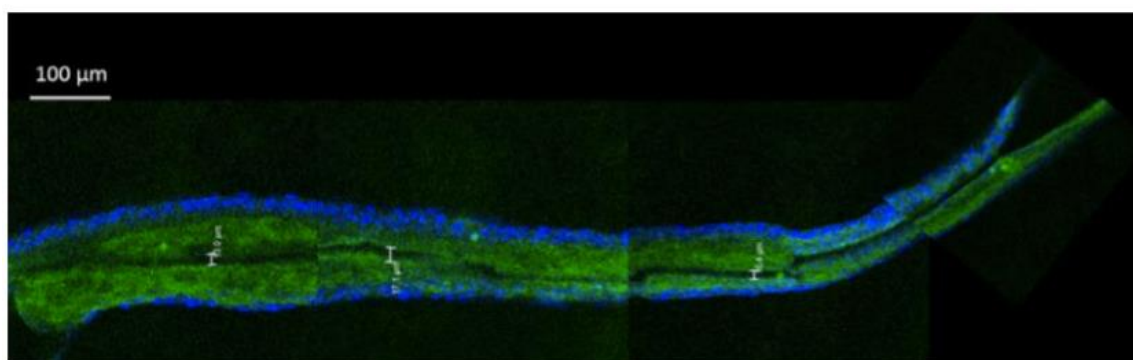
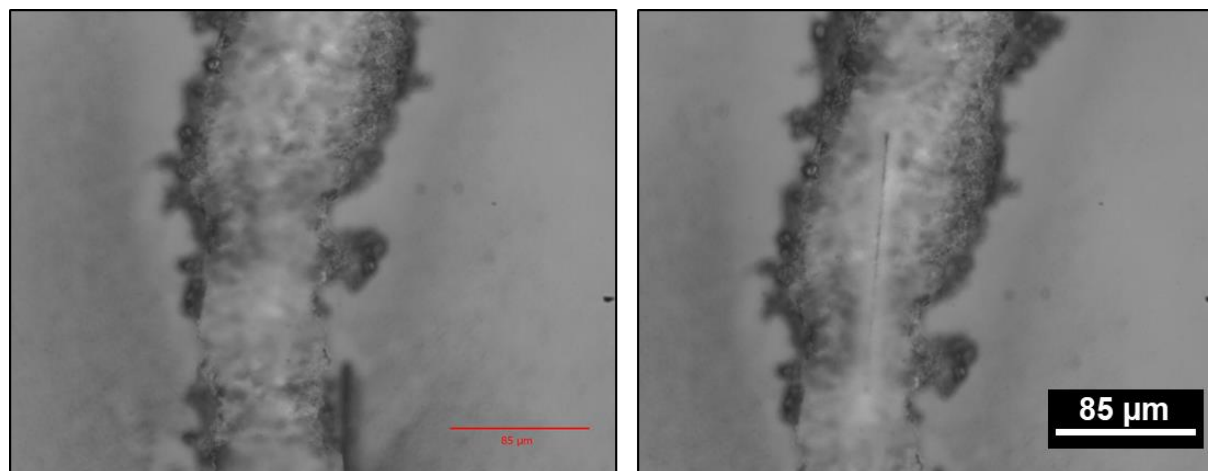


Figure 51 Reconstruction de plusieurs prises de vues en microscopie confocale d'une microfibre fixée au PFA et usinée par laser fs. En bleu, marquage DAPI des noyaux cellulaires, en vert : autofluorescence du collagène [125].

I.2. Premiers essais sur fibres vivantes

Ce travail de thèse se différencie par rapport aux travaux précédents en usinant des microfibres vivantes. Les premiers essais sur fibres vivantes se sont inspirés des paramètres lasers optimisés avec les fibres fixées au PFA 4 %. Le résultat du premier usinage est présenté sur la Figure 52. La microfibre a été usinée avec un laser à 1030 nm, de durée d'impulsion de 350 fs, avec une cadence de tir de 50 kHz et une fluence $F = 36,8$ J/cm². Le taux de recouvrement a été arbitrairement fixé à 99,77 %. Comme pour les fibres fixées, la fibre a été déposée sur une lame de verre avant usinage. La fibre s'est alors complètement aplatie en raison de l'absence de milieu de culture et de la capacité des cellules à fortement adhérer sur du verre. Bien que le tir laser soit focalisé au centre de la microfibre, la microfibre était trop

fine pour réaliser un usinage intravolumique et la paroi cellulaire externe a été ablatée sans observer de phénomène de cavitation.



Avant tir laser

Après tir laser

Figure 52 Image d'une microfibre placée sur une lame de verre avant et après usinage laser.
Paramètres laser : 1030 nm ; RR = 50 kHz ; F = 36,8 J/cm² ; OL = 99,7 % ; N = 1 ; D = 50 μm.

Ces premiers essais ont montré la nécessité d'hydrater les microfibres pendant l'usinage et de choisir un support échantillon limitant l'adhésion cellulaire. Dans ce but, des travaux d'optimisation du support échantillon ont été conduits et présentés dans le chapitre II, paragraphe II.3.1. Le support échantillon est un puit de culture recouvert d'une couche d'agarose. En effet, l'agarose est connu pour minimiser l'adhésion des cellules tout en préservant la viabilité cellulaire [126]. Lorsque le revêtement d'agarose est combiné avec l'ajout de quelques gouttes de milieu de culture, la fibre n'est plus aplatie et conserve sa forme cylindrique tridimensionnelle. Avec ce support, le diamètre moyen de la fibre reste d'environ 200 μm et le tir laser peut être focalisé à l'intérieur du cœur de collagène pour générer des bulles de cavitation.

II. Influence des paramètres lasers pendant l'usinage

Comme pour la gélatine, l'analyse de l'interaction laser matière s'est appuyée à la fois sur les clichés des bulles de cavitation prises 5 secondes après l'usinage et sur les images obtenues par microscopie confocale 24 heures plus tard après application d'un marquage Live/Dead®. L'ensemble de ces travaux ont permis d'étudier l'influence de cinq paramètres lasers : la profondeur de tir (D), la fluence (F), le nombre de passage laser (N), la cadence de tir (RR) et le taux de recouvrement (OL). Ces deux derniers paramètres jouent un rôle primordial sur les phénomènes thermiques et seront traités ensemble. L'ensemble des expériences a été

conduite avec la même longueur d'onde (1030 nm), la même durée d'impulsion laser (350 fs) et un point focal de 3 μm de diamètre environ. Pour chacun des paramètres lasers étudiés, l'analyse s'est effectuée en deux temps : 5 secondes après le tir pour analyser le comportement des bulles de cavitation et 24 heures après pour repérer la présence ou l'absence d'un canal intravolumique et identifier les signes d'endommagement de la paroi externe et la baisse de viabilité cellulaire.

II.1. Influence de la profondeur de tir

Le diamètre externe moyen d'une microfibre mesure environ 200 μm . Pour créer un canal au centre de la microfibre, le faisceau laser doit pouvoir être focalisé à une profondeur de 100 μm .

II.1.1. Influence de la profondeur de tir juste après l'interaction laser

La première partie des essais a consisté à comprendre l'influence de la profondeur de tir à l'intérieur de fibres de 200 μm de diamètre externe. La profondeur de tir (D), également appelé profondeur du point focal laser, est ici définie par rapport à la surface de la fibre traversée en premier par le faisceau laser comme illustré sur la Figure 53.

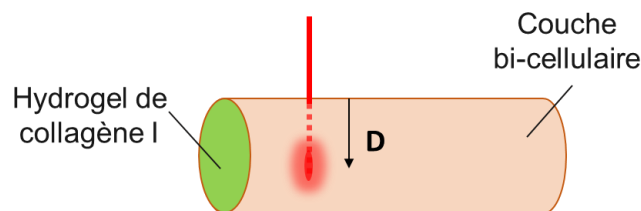


Figure 53 Schéma illustrant la profondeur du point focal D à l'intérieur d'une microfibre de 200 μm de diamètre. Lorsque le point focal laser est ciblé sur la surface de la fibre, $D = 0 \mu\text{m}$.

Plusieurs microfibres ont été usinées pour différentes profondeurs variant entre $D = 30 \mu\text{m}$ et $D = 150 \mu\text{m}$ depuis la surface.

- **Paramètres fixes** : 50 kHz ; $F = 22,1 \text{ J/cm}^2$; OL = 99,7 % ; N = 2
- **Variable** : Profondeur du point focal laser, D : 30 μm ; 50 μm ; 100 μm et 150 μm

Chacune de ces 4 conditions a été répétée 4 fois sur des fibres différentes. La Figure 54 illustre le type de bulles obtenues pour chaque condition laser.

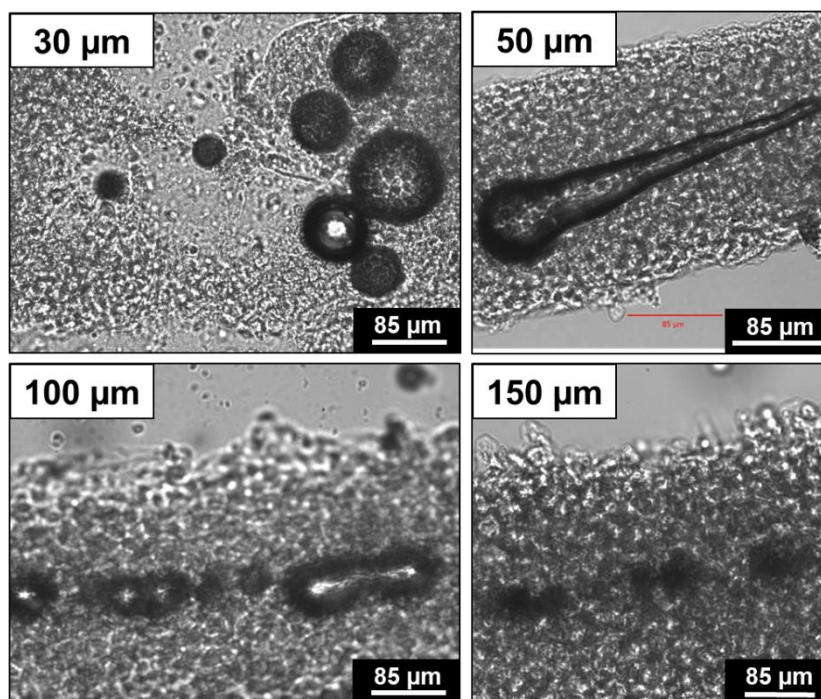


Figure 54 Tirs lasers successifs réalisés sur différentes fibres avec variation de la profondeur du point focal. Paramètres fixes : 1030 nm ; RR = 50 kHz ; F = 22,1 J/cm² ; OL = 99,7 % ; N = 2
Profondeur du point focal variable : 30 μm ; 50 μm ; 100 μm et 150 μm.

Lorsque la profondeur de tir augmente, les bulles obtenues sont de plus en plus petites et ont une durée de vie de plus en plus courte. Ainsi, pour $D = 30 \mu\text{m}$, les bulles de cavitation formées sont très volumineuses et exercent une forte pression mécanique sur la paroi de la fibre jusqu'à la rupture de cette dernière dès le premier passage laser.

Lorsque le tir est focalisé plus en profondeur, les bulles se forment plus loin de la paroi avec un diamètre plus petit, conservant ainsi l'intégrité de la paroi cellulaire. Pour $D = 50 \mu\text{m}$, de grosses bulles de cavitation sont observées avec une durée de vie dépassant les 30 minutes en moyenne. Après un second passage laser, on peut observer la formation d'une longue bulle en forme de comète s'allongeant dans le sens de la trajectoire laser. La bulle visible sur la Figure 54 possède une longueur de 300 μm et une largeur de 54 μm au niveau de la tête de la comète. Cette bulle était toujours visible au microscope optique 1 h 30 après usinage mais sa longueur était divisée par 4.

Lorsque la profondeur continue d'augmenter jusqu'à $D = 100 \mu\text{m}$, des petites et moyennes bulles de cavitation se forment lors du premier passage laser. Après un second passage laser, la largeur moyenne des bulles observées était de 32,8 μm. Certaines bulles ont également fusionné ensemble pour former des bulles allongées dans le sens de l'usinage. Leur durée de vie pouvait varier entre 30 secondes et plusieurs minutes. Cependant, après 20 minutes, la majorité des bulles avaient disparues.

Enfin, pour une profondeur de 150 μm , peu de bulles sont observées après le premier passage. Après deux passages lasers, de petites bulles, d'une largeur moyenne de 18,9 μm apparaissent puis disparaissent en moins de 30 secondes. Sur la Figure 54 on peut ainsi voir une légère brume correspondant à de très petites bulles de cavitation, difficilement discernables à cette profondeur.

II.1.2. Influence de la profondeur de tir 24 h après l'interaction laser

Afin d'étudier l'influence de la profondeur de tir sur la présence d'un canal intravolumique ou non, les images de L/D[®] obtenues au microscope confocal ont été analysées pour trois profondeurs de tirs : 50 μm , 100 μm et 140 μm et pour différents jeux de paramètres laser. Environ une vingtaine de fibres ont été analysées pour chaque profondeur sauf pour D = 30 μm où seulement 4 fibres ont été usinées.

L'analyse de chaque image avait deux buts :

- repérer la présence et la position du canal laser à l'intérieur de la microfibre,
- repérer les signes d'endommagements de la paroi cellulaire.

En fonction de la profondeur de tir et du type d'interaction observé, les microfibres étaient ensuite classées en trois catégories :

- soit un canal ou une forte perte de signal étaient observés au centre de la matrice de collagène sans endommagement de la paroi extérieure de la fibre,
- soit un endommagement de la paroi cellulaire était observé (présence de cratères, de trous ou absence totale de signal vert à la périphérie),
- soit aucune modification morphologique n'était observée.

Le Tableau 4 indique la répartition des microfibres usinées en fonction de la profondeur de tir appliquée pendant l'usinage et du type d'interaction observée.

Tableau 4 : Pourcentage de microfibres usinées en fonction du type de modification laser observée (présence d'une atténuation du signal central, endommagement de la surface extérieure, pas d'interaction visible) vis-à-vis de la profondeur du point focal laser à l'intérieur de la fibre pendant l'usinage. Profondeurs étudiées : D = 30 μm , D=50 μm , D=100 μm et D=140 μm .

	D = 30 μm	D = 50 μm	D = 100 μm	D = 140 μm
Atténuation du signal central, surface préservée	0 %	40 %	50 %	27 %
Surface externe endommagée	100 %	40 %	33 %	60 %
Aucune interaction visible	0 %	20 %	17 %	13 %

L'analyse des images L/D® montre que les canaux intravolumiques sont plus faciles à générer à de faibles profondeurs en raison de la faible absorption de l'énergie laser par le reste du matériau. Pour 30 µm de profondeur, la structure de la fibre étant totalement dégradée, aucun canal ne peut se former. En revanche, lorsque le faisceau est focalisé entre 50 µm et 100 µm, 40 % à 50 % des fibres usinées possèdent un canal intravolumique contre seulement 27 % des microfibres à 140 µm.

Lorsque le volume focal est localisé trop près de la paroi cellulaire, le laser peut créer des dommages cellulaires. Par exemple, pour $D = 30\text{ }\mu\text{m}$, le laser est focalisé trop proche de la surface et désagrège les fibres. En focalisant le tir laser 20 µm en dessous, plus que 40 % des fibres usinées voient leur paroi cellulaire endommagée. Cette tendance s'accroît pour $D = 100\text{ }\mu\text{m}$ lorsque le point focal laser est situé au centre de la microfibre, point le plus éloigné de la paroi cellulaire. A cette profondeur, seulement 33 % des microfibres présentent des signes d'endommagement de la paroi tels que des gravures laser ou des cratères. Pour $D = 140\text{ }\mu\text{m}$, le point focal laser se rapproche de la paroi cellulaire inférieure. Le nombre de fibres endommagées réaugmente alors à 60 %.

II.2. Influence de la fluence

II.2.1. Influence de la fluence juste après l'interaction laser

Le comportement des bulles de cavitation est ici décrit à la suite de plusieurs tirs successifs réalisés à l'intérieur d'une même fibre en augmentant progressivement la fluence de 19,6 J/cm² jusqu'à 36,8 J/cm². La cadence laser a été fixée à 50 kHz, avec une vitesse de déplacement des platines de 0,5 mm/s correspondant à un taux de recouvrement de 99,7 %. Les tirs ont été réalisés à une profondeur de 90 µm avec un seul passage laser. Cette expérience a été réalisée sur 2 fibres différentes.

Tout comme avec le modèle de gélatine, augmenter la fluence permet d'augmenter le diamètre moyen des bulles de cavitation et leur durée de vie à l'intérieur de la microfibre. La Figure 55 illustre cette évolution pour 4 valeurs de fluences différentes : 19,6 ; 31,9 ; 34,4 et 36,8 J/cm². Les photos du haut montrent ce qui se passe à l'intérieur de la fibre au niveau du plan focal tandis que les photos du bas montrent la paroi cellulaire externe après usinage.

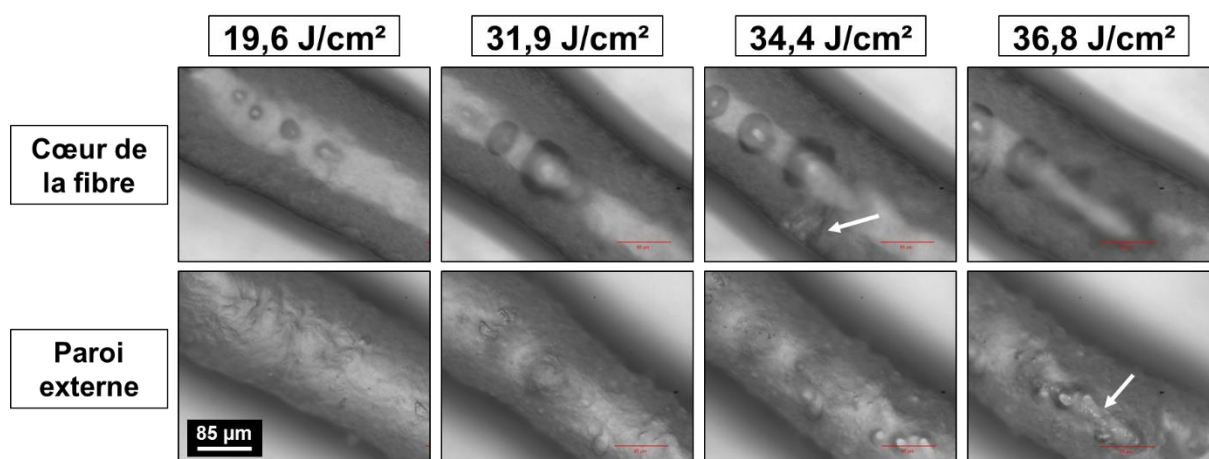


Figure 55 Tirs lasers successifs réalisés à l'intérieur d'une même fibre pour différentes valeurs de fluence : 19,6 ; 31,9 ; 34,4 et 36,8 J/cm². Les images du haut représentent le cœur de la microfibre où les bulles se forment. Les images du bas montrent pour chaque fluence l'état de la paroi cellulaire après usinage. Les flèches blanches indiquent la présence de dommage sur la paroi cellulaire.

Paramètres fixes : 1030 nm ; RR = 50 kHz ; OL = 99,7 % ; N = 1 ; D = 90 µm.

On peut voir que pour $F = 19,6 \text{ J/cm}^2$, les bulles formées ont un diamètre moyen de 25 µm. Ce diamètre passe à 85 µm pour 31,9 J/cm². Pour ces fluences, la paroi cellulaire demeure intacte. Seule l'ombre des bulles présentes à l'intérieur de la microfibre est visible en surface. Lorsqu'on continue d'augmenter la fluence, les bulles deviennent suffisamment grosses pour percer la paroi cellulaire. Ainsi, à 34,4 J/cm², la photo montre un trou dans la paroi créé par une bulle de cavitation très volumineuse (Figure 55, flèche blanche). Si on continue d'augmenter la fluence jusqu'à 36,8 J/cm², la paroi cellulaire est à son tour endommagée (seconde flèche blanche pour $F = 36,8 \text{ J/cm}^2$). Bien que la surface soit abîmée, des bulles de cavitation sont toujours visibles à l'intérieur de la microfibre.

II.2.2. Influence de la fluence 24 h après l'interaction laser

L'étude de l'évolution de la viabilité selon la fluence utilisée a été réalisée pour le jeu de paramètres suivant :

- Paramètres fixes : RR = 50 kHz ; OL = 99,7 %, D = 100 µm et N = 1,
- Variables : 4 valeurs de fluences différentes : 19,6 ; 22,1 ; 24,5 et 27,0 J/cm²

Quatre microfibres différentes ont été usinées pour chaque jeu de paramètres laser.

Le Tableau 5 résume le pourcentage de microfibres viables et non viables 24 h après l'usinage pour les paramètres laser appliqués. Pour $F \geq 27,0 \text{ J/cm}^2$, toutes les fibres usinées sont mortes. La fluence est trop élevée pour conserver la viabilité cellulaire. En revanche, pour des fluences modérées la viabilité cellulaire ne semble pas corrélée aux valeurs de fluence, mais plutôt au temps passé sur le support échantillon. Les fibres non viables correspondent en effet aux microfibres ayant passé entre 26 et 41 minutes sur leur support échantillon avec une très faible quantité de milieu culture, tandis que les fibres viables y sont restées moins de 25

minutes. Le lien entre la perte de viabilité cellulaire et le temps passé avec une hydratation limitée sera discuté au paragraphe III.1.

Tableau 5 : Pourcentage de microfibres viables ou non viables après usinage laser en fonction de la fluence laser pour RR = 50 kHz, OL = 99,7 %, D = 100 μ m et N = 1.

	19,6 J/cm²	22,1 J/cm²	24,5 J/cm²	27,0 J/cm²
Viables	0 %	50 %	75 %	0 %
Non viables	100 %	50 %	25 %	100 %

Le Tableau 6 suivant indique la répartition des microfibres usinées en fonction du type de modifications observées après usinage et de la fluence. Les microfibres sont classées selon trois catégories : les fibres possédant un canal ou un affaiblissement du signal central dans le centre du collagène sans altération de la paroi cellulaire, les fibres possédant un canal ou affaiblissement du signal central dont la surface est altérée par le laser et enfin, les fibres ne possédant aucun signe visible de l'usinage laser.

Tableau 6 : Pourcentage de microfibres usinées en fonction du type de modifications laser observé (présence d'une atténuation du signal au centre de la microfibre, endommagement de la surface externe, aucune interaction visible) vis-à-vis de la fluence appliquée.

	19,6 J/cm²	22,1 J/cm²	24,5 J/cm²	27,0 J/cm²
Modification interne, surface préservée	50 %	25 %	25 %	0 %
Modification interne + paroi externe endommagée	0 %	25 %	50 %	100 %
Aucune interaction visible	50 %	50 %	25 %	0 %

Pour les deux fluences les plus faibles, $F = 19,6 \text{ J/cm}^2$ et $F = 22,1 \text{ J/cm}^2$, l'usinage dans le cœur de collagène est visible pour la moitié des fibres. Lorsque les fibres sont mortes après l'usinage, on peut observer un canal nettement dessiné et fin (largeur de 17 μ m en moyenne). Pour les fibres viables, l'usinage se traduit par un affaiblissement du signal rouge provenant de la matrice de collagène le long de la trajectoire laser par rapport au signal avant usinage. Lorsque la fluence continue d'augmenter, la probabilité d'observer les traces du passage laser augmente. En effet, des modifications intravolumiques sont observés pour 75 % des microfibres avec $F = 24,5 \text{ J/cm}^2$ et pour 100 % des microfibres avec $F = 27,0 \text{ J/cm}^2$. Cependant, lorsque la fluence augmente, l'endommagement de la paroi cellulaire augmente

également. Ainsi, pour $F = 27,0 \text{ J/cm}^2$, la totalité des fibres usinées voient leur surface endommagée après l'usinage.

II.3. Influence du nombre de passage laser

II.3.1. Influence du nombre de passage laser juste après l'interaction laser

Pour étudier l'influence du nombre de passages, plusieurs passages successifs ont été réalisés sur une même fibre avec un temps de repos de 30 secondes. Les bulles de cavitation formées étaient photographiées durant ce délai.

La Figure 56 représente l'évolution des bulles de cavitation 5 secondes après la fin de chaque passage laser pour les paramètres suivants : $RR = 50 \text{ kHz}$, $F = 12,3 \text{ J/cm}^2$, $OL = 99,7 \%$ et $D = 100 \text{ }\mu\text{m}$.

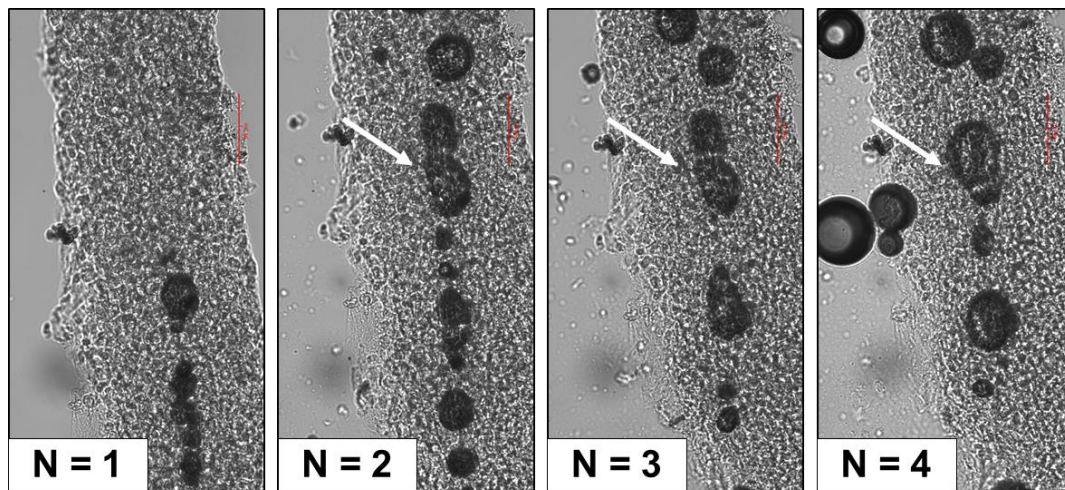


Figure 56 Photographies d'une même fibre prise après chaque passage laser successif, de $N = 1$ à $N = 4$, avec des paramètres lasers identiques. Les flèches blanches illustrent un exemple de fusion de deux bulles après plusieurs passages laser.

Paramètres fixes : 1030 nm ; $RR = 50 \text{ kHz}$; $F = 12,3 \text{ J/cm}^2$; $OL = 99,7 \%$; $D = 100 \text{ }\mu\text{m}$.

Après le premier passage ($N = 1$), les bulles de cavitation grossissent jusqu'à atteindre un diamètre maximal puis entament une phase de décroissance. Dans les 30 secondes précédents le deuxième passage, les petites bulles formées (diamètre moyen $< 20 \text{ }\mu\text{m}$), disparaissent totalement tandis que les grosses bulles (diamètre moyen $> 20 \text{ }\mu\text{m}$) rétrécissent progressivement et sont toujours présentes juste avant le second tir.

Pour $N = 2$, plusieurs phénomènes sont observés :

- Lorsque toutes les bulles formées à $N = 1$ ont disparu, de nouvelles bulles de cavitations peuvent se former au même endroit. Leur taille et leur vitesse de décroissance sont similaires à celles formées à $N = 1$.
- Lorsque les bulles formées à $N = 1$ sont toujours présentes juste avant $N = 2$, les bulles suivent une seconde phase d'expansion dans les quelques secondes suivant le dernier impact laser pour atteindre un diamètre maximal plus grand qu'à $N = 1$. Les bulles entament ensuite une seconde phase de décroissance plus lente que lors du premier passage.
- Deux bulles présentes juste avant $N = 2$ peuvent fusionner ensemble si elles entrent en contact pendant leur phase d'expansion. Elles forment alors une bulle unique non sphérique s'allongeant selon la direction de la trajectoire laser. La bulle nouvellement formée amorce ensuite un processus d'expansion/décroissance dont la vitesse de décroissance semble plus lente qu'à $N = 1$.
- Une trainée peut être observée entre plusieurs bulles de cavitation proches. Ce phénomène a été observé lorsque des petites bulles de cavitation sont très rapprochées les unes des autres juste avant le second tir (Figure 57).

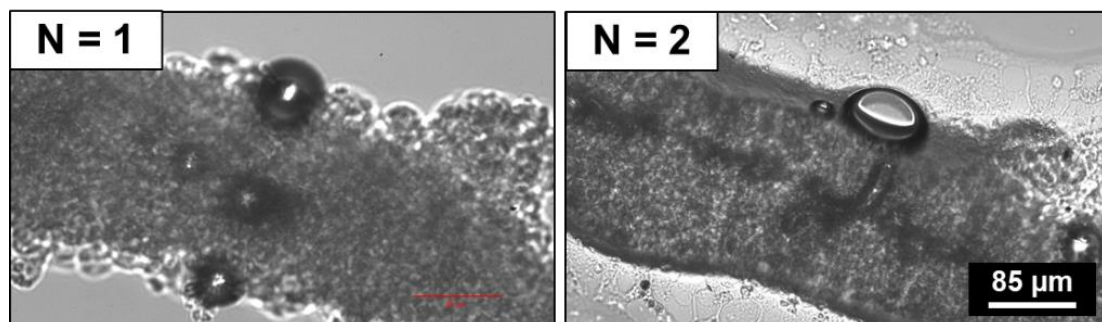


Figure 57 Fibres usinées avec 2 passages laser. Chacune des images montre les bulles de cavitation formées 5 secondes après chaque passage laser (pour $N = 1$ et $N = 2$) avec les mêmes paramètres. Paramètres fixes : 1030 nm ; RR = 50 kHz ; $F = 12,3 \text{ J/cm}^2$; OL = 99,7 % ; $D = 100 \text{ µm}$.

Les mêmes observations sont faites lors de passages laser plus élevés. Toutefois, au fur et à mesure des passages, les bulles qui grossissent exercent une pression mécanique de plus en plus élevée sur la paroi cellulaire et peuvent entraîner la rupture de cette dernière.

II.3.2. Influence du nombre de passage laser 24 h après l'interaction laser

L'étude de l'influence de N sur la formation d'un canal intravolumique s'est effectuée à partir des images des marqueurs fluorescents L/D® obtenues au microscope confocal. Deux jeux de

paramètres laser ont été appliqués pour les nombres de passages suivants : 1, 3, 5, 7 et 10 passages.

Le premier jeu de paramètre choisi permet de générer majoritairement des bulles de cavitation petites à moyenne lors du premier passage laser :

- Usinage laser à 50 kHz avec une fluence de 22,1 J/cm², à 130 µm de profondeur pour un taux de recouvrement de 99,7 %.

Le second jeu de paramètre a été choisi pour générer majoritairement des bulles de cavitation plus volumineuses à N = 1 :

- Usinage laser à 10 kHz avec une fluence de 24,5 J/cm², à 100 µm de profondeur pour un taux de recouvrement de 98,5 %.

Chaque condition a été répétée deux fois.

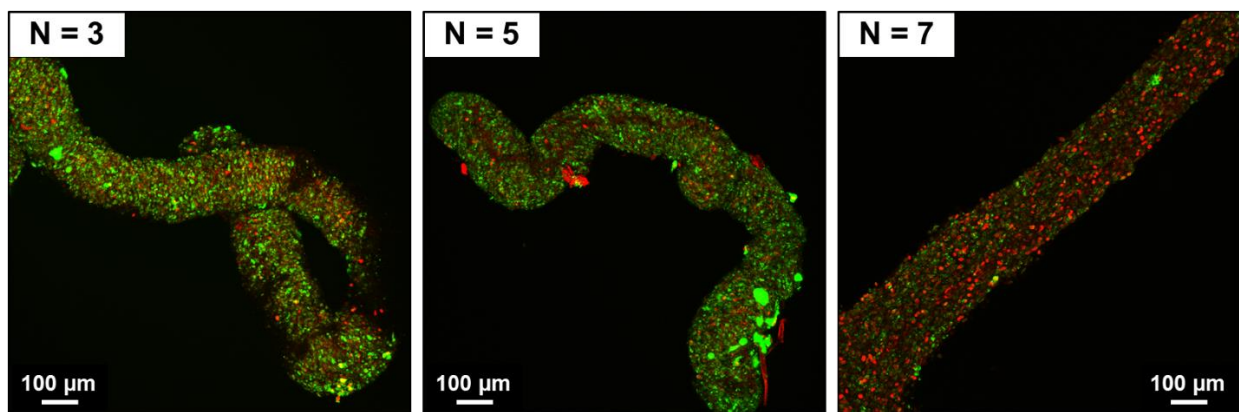


Figure 58 Marquages Live/Dead® appliqués sur trois fibres différentes et usinées avec les mêmes paramètres lasers mais un nombre de passage différents. A gauche : N = 3 ; au centre : N = 5 ; à droite : N = 7. Paramètres fixes : 1030 nm ; RR = 50 kHz ; F = 22,1 J/cm² ; OL = 99,7 % ; D = 130 µm.

La Figure 58 représente trois images de L/D® obtenues pour trois valeurs de N différentes.

Pour N = 1, des canaux intravolumiques ont pu être détecté pour la moitié des fibres. Pour l'autre moitié, aucune modification laser n'a été détectée. En revanche pour N > 1, la présence d'un canal intravolumique ou d'une perte de signal en provenance de la matrice extracellulaire a pu être détectée systématiquement, indépendamment des paramètres laser. Jusqu'à N = 5, ces canaux sont plus difficilement détectables pour 20 % des échantillons. Ces échantillons correspondent aux fibres dont la viabilité cellulaire a été la mieux préservée. Ici, un léger affaiblissement de la densité de collagène dans le cœur de la fibre est visible mais aucun canal net et fin n'est détecté (Figure 59).

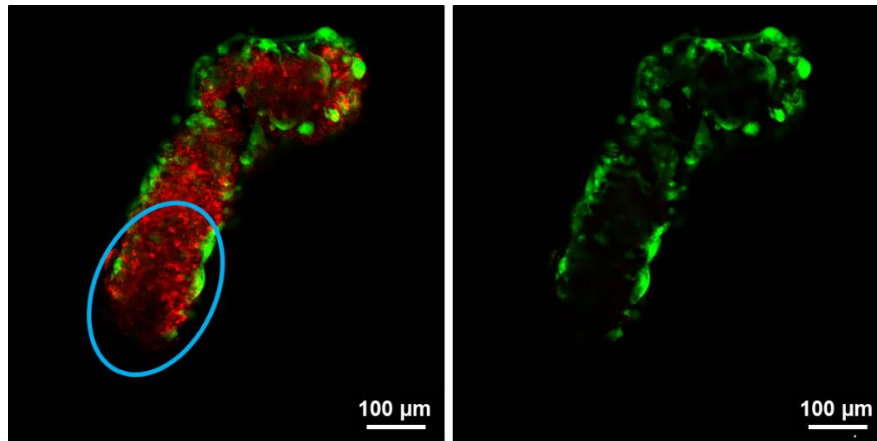


Figure 59 À gauche : Affaiblissement de la densité de signal dans le cœur de collagène d'une fibre vivante après $N = 3$. Les couleurs ont été modifiées pour visualiser l'impact laser. Le vert correspond aux cellules viables tandis que le rouge est surexprimé afin d'observer le signal de fluorescence provenant de la matrice extracellulaire. **À droite :** Couleurs non modifiées. Image attestant de la bonne viabilité cellulaire de la microfibre après usinage. Paramètres : 1030 nm ; RR = 50 kHz ; F = 22,1 J/cm² ; OL = 99,7 % ; N = 1 ; D = 130 µm.

En revanche, lorsque la viabilité cellulaire n'a pas été préservée, un canal net est visible au centre de la fibre (Figure 60). Ce canal s'accompagne également d'un affaiblissement du signal de viabilité le long du canal.

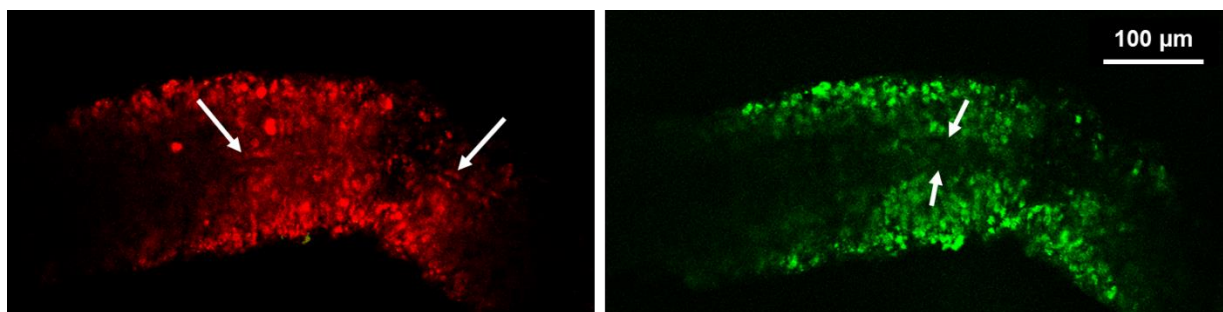


Figure 60 À gauche : Canal très fin et très net à l'intérieur de la microfibre pour $N = 3$. Le signal rouge est augmenté afin d'observer la fluorescence de la matrice extracellulaire. **À droite :** Affaiblissement du signal vert autour du canal. Paramètres : 1030 nm ; RR = 50 kHz ; F = 22,1 J/cm² ; OL = 99,7 % ; N = 1 ; D = 120 µm.

Pour $1 < N \leq 5$, la présence des canaux intravolumiques s'accompagne d'une détérioration de la paroi cellulaire pour la moitié des échantillons usinés (Figure 58, $N = 5$). Cependant, l'endommagement de la paroi ne semble pas corrélé aux paramètres lasers appliqués, ni au nombre de passages laser utilisés.

Pour $N \geq 7$, les canaux formés sont visuellement très marqués. Pour 75 % des canaux détectés, la périphérie cellulaire de la microfibre est caractérisée par des cellules altérées (Figure 58, $N = 5$ et $N = 7$). Les cellules présentes sur la trajectoire laser sont toutes mortes sous l'impulsion laser.

L'influence de N sur la viabilité cellulaire a également pu être réalisée à partir des résultats précédents et des images présentées sur la Figure 58.

Pour $N \leq 5$, environ 80 % des fibres usinées sont mortes indépendamment du nombre de passages appliqué ou du jeu de paramètres laser utilisé. Quelques rares signaux témoignent de la présence de cellules viables, mais la majorité des cellules présentent des signes d'apoptose (Figure 58, $N = 3$ et $N = 5$).

Pour $N \geq 7$, la totalité des cellules composant les microfibres usinées sont mortes, indépendamment des paramètres laser appliqués. Le L/D® affiche des signaux caractéristiques de cellules pycnotiques, en apoptose. Aucun signal de viabilité cellulaire n'a pu être observé (Figure 58, $N = 7$).

II.4. Influence des effets thermiques : cadence de tir et recouvrement

II.4.1. Influence de la cadence et de la dose juste après l'interaction laser

L'influence des effets thermiques a été étudiée en comparant l'usinage des microfibres pour deux cadences différentes : 10 kHz et 50 kHz et 3 valeurs de recouvrement : 99,7 %, 98,5 % et 96,9 %. Ces essais ont été réalisés avec une fluence $F = 24,5 \text{ J/cm}^2$, à 100 μm de profondeur après un seul passage laser. 2 fibres ont été usinées pour chaque paramètre.

La Figure 61 montre le profil des bulles de cavitation photographiées 5 secondes après le tir laser pour chaque paramètre.

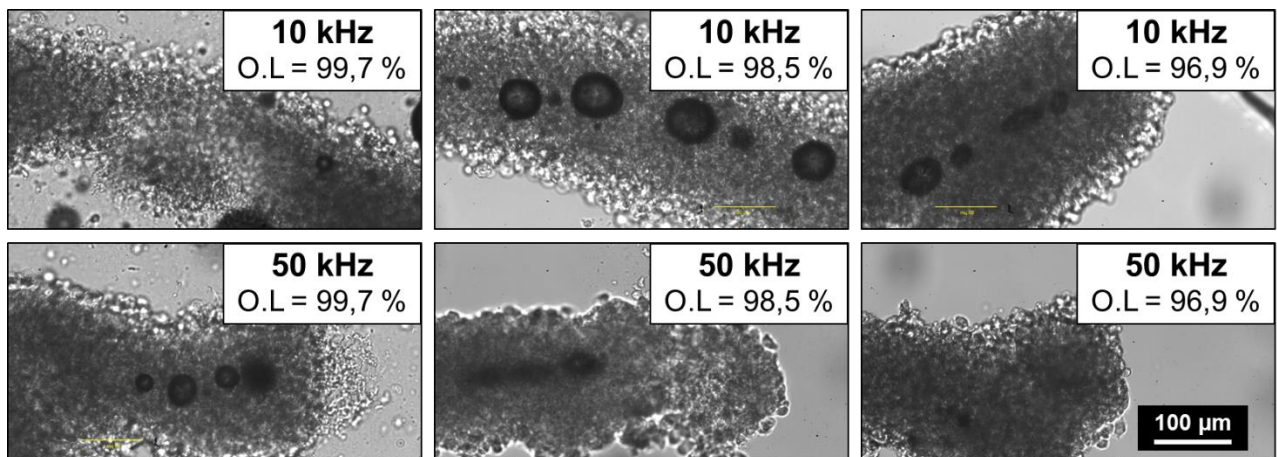


Figure 61 Tirs lasers successifs réalisés sur différentes fibres à 10 kHz (en haut) et 50 kHz (en bas) pour trois valeurs de recouvrement différentes : 99,7 % (à gauche), 98,5 % (au centre) et 96,9 % (à droite). Paramètres fixes : 1030 nm ; RR = 10 kHz ; $F = 24,5 \text{ J/cm}^2$; $N = 1$; $D = 100 \mu\text{m}$

.A 10 kHz et un recouvrement de 96,90 %, des bulles de cavitation moyennes se forment après le tir laser. Leur diamètre moyen est de 22,5 μm et ont une durée de vie variable, d'1 ou 2 minutes à 30 minutes. Lorsque le recouvrement augmente à 10 kHz, les bulles sont de plus en plus volumineuses et persistent plus longtemps dans le cœur des fibres. Ainsi pour OL = 98,5 %, le diamètre moyen des bulles observées est de 54,6 μm et leur durée de vie oscillent entre quelques minutes et 1 h 30. Au bout de 30 minutes, la majorité de ces bulles sont toujours

présentes dans le cœur de la fibre. Pour OL = 99,7 %, les bulles sont trop volumineuses pour les fibres usinées et perforent ou déchirent la paroi cellulaire.

Pour les mêmes valeurs de recouvrement étudiées, mais à une cadence plus rapide (50 kHz), les bulles formées sont en moyenne plus petites et disparaissent plus vite. Ainsi, pour OL = 96,9 %, les bulles ont un diamètre moyen de 11,5 μm et disparaissent dans les 10 secondes suivant le tir laser. Pour OL = 98,5 %, le diamètre moyen est de 19,9 μm et les bulles ont totalement disparues 30 secondes après le tir laser et pour OL = 99,7 %, elles mesurent 30,1 μm et persistent dans le cœur des fibres de quelques minutes à 1 h 30. Un tiers des bulles sont encore présentes 30 minutes après la fin de l'usinage.

II.4.2. Influence de la cadence et de la dose 24 h après l'interaction laser

La Figure 62 montre l'influence de la dose et du taux de recouvrement sur la viabilité cellulaire. Ici, nous avons étudié 2 valeurs de cadence : 10 kHz et 50 kHz et 2 valeurs de recouvrement : 98,5 % et 99,7 %. Le Tableau 7 décrit les différents types d'interactions retrouvés à l'intérieur des microfibres pour ces jeux de paramètres. Pour chaque jeu de paramètres lasers, 2 fibres ont été usinées.

Tableau 7 : Tableau décrivant le type d'interactions observées après usinage des microfibres par usinage laser à 10 kHz et 50 kHz pour deux valeurs de recouvrement différentes : 98,5 % et 99,7 %. Analyse réalisée sur 2 fibres pour chaque jeu de paramètres

	OL = 99,7 %	OL = 98,5 %
RR = 10 kHz	Fibres détruites après que des bulles aient percé la paroi cellulaire	Signal atténué au centre de la fibre, diminution du nombre de cellules répartie sur toute la fibre
RR = 50 kHz	Signal atténué au centre de la fibre, diminution du nombre de cellules localisée le long de la trajectoire laser	Signal atténué au centre de la fibre, diminution du nombre de cellules localisée le long de la trajectoire laser

A 10 kHz pour OL = 98,5 %, une atténuation du signal provenant du cœur d'hydrogel est visible par rapport aux images de L/D® avant usinage. On observe également une diminution du nombre de cellules sur la paroi cellulaire. En mesurant la surface du signal de viabilité par rapport à la surface totale de la fibre, la proportion de cellules viables représente 38 % de la surface totale de la microfibre contre 87 % avant l'usinage. Pour OL = 99,7 %, un taux de recouvrement plus élevé, la viabilité cellulaire chute drastiquement. Sur la Figure 62, deux zones distinctes sont repérables. La zone avec une mortalité cellulaire majeure correspond à l'endroit où la paroi de la microfibre a rompu sous l'action des bulles de cavitation. Dans cette

zone, la fibre est totalement endommagée et aucun canal n'est visible. La zone viable du point de vue cellulaire n'a pas été usinée.

Pour 50 kHz, une diminution du signal provenant du cœur de collagène est visible par rapport aux images de L/D® avant usinage. On peut également observer une légère diminution du nombre de cellules viables sur la paroi cellulaire après usinage laser. Cette diminution s'accroît lorsque le taux de recouvrement augmente. Ainsi, pour OL = 98,5 %, la viabilité occupe 66 % de la surface totale contre 91 % avant l'usinage. Pour OL = 99,7 %, la viabilité occupe 92 % contre 97 % après usinage. Contrairement à 10 kHz où la diminution de la viabilité cellulaire est répartie sur toute la surface de la fibre, à 50 kHz, cette perte de signal est localisée le long de la trajectoire du laser.

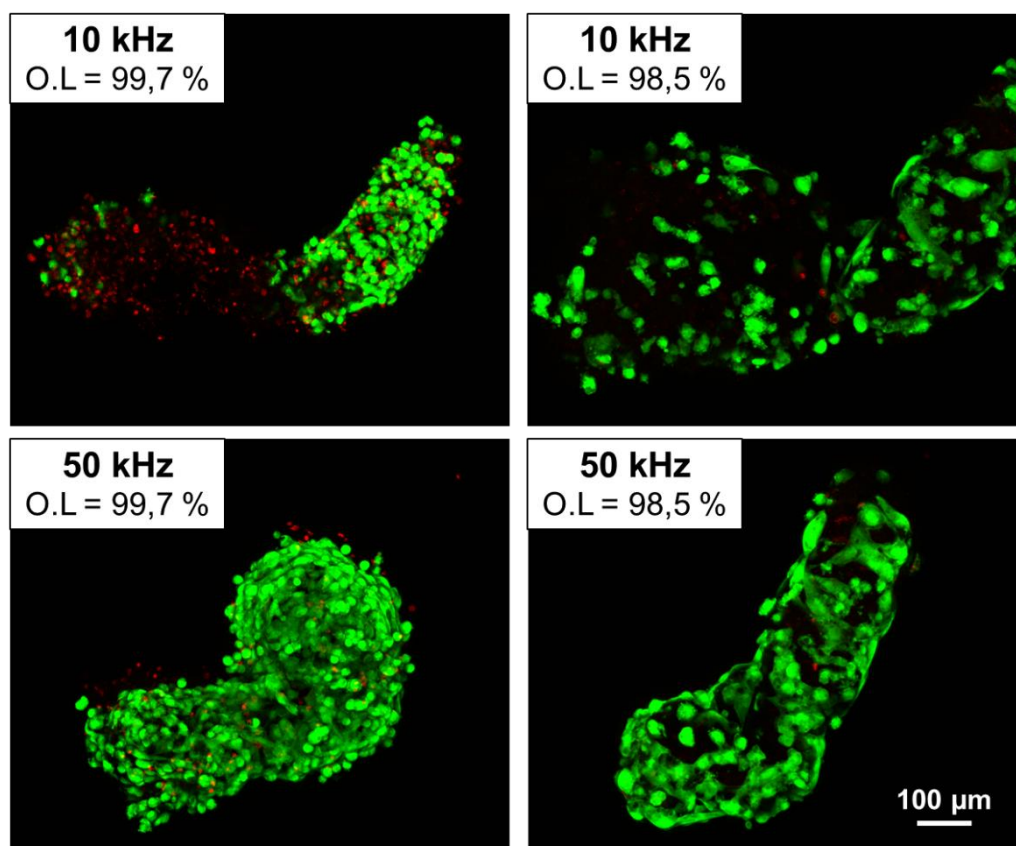


Figure 62 Marquages Live/Dead® appliqués sur quatre fibres différentes usinées à 10 kHz (en haut) et 50 kHz (en bas) pour deux valeurs de recouvrement différentes : 99,7 % (à gauche) et 98,5 % (à droite). Paramètres fixes : 1030 nm ; RR = 10 kHz ; F = 24,5 J/cm² ; N = 1 passage ; D = 100 μm.

III. Paramètres extérieurs influençant l'usinage laser

III.1. Influence de l'hydratation sur la viabilité cellulaire

Les cellules ont besoins d'un apport constant en hydratation et nutriments. Un support échantillon recouvert d'un fond d'agarose a donc été utilisé pour conserver au mieux

l'hydratation des microfibres pendant l'usinage laser. Lorsque les fibres étaient déposées sur le support, quelques microlitres de milieu de culture étaient ajoutés afin d'observer une fine pellicule de milieu enveloppant la microfibre. Cependant, 24 heures après l'usinage, les images de L/D® montraient une chute de viabilité cellulaire sur toute la microfibre, indépendamment des paramètres laser étudiés (Figure 58).

Pour comprendre l'origine de la mortalité cellulaire, l'utilisation de microfibres contrôles a été mise en place. Chaque fibre usinée était accompagnée d'une seconde fibre contrôle non usinée. La bonne viabilité des fibres étaient contrôlées la veille de l'usinage. Juste avant l'usinage, les deux fibres étaient déposées sur le support échantillon avec quelques gouttes de milieu de culture. Une seule des deux fibres étaient usinées puis, une fois l'usinage terminé, les deux fibres retournaient dans leur eppendorf rempli de milieu de culture. Leur viabilité était de nouveau contrôlée 24h après. Ces microfibres contrôles sont identifiées comme le groupe « contrôle support échantillon » dans la suite de ce chapitre.

Un deuxième groupe contrôle a également été utilisé pour étudier l'évolution de la viabilité cellulaire sur des fibres non usinées et restant totalement immergées dans le milieu de culture durant la journée d'usinage (salle d'usinage climatisée à 21°C). Leur viabilité était contrôlée la veille et le lendemain du jour d'usinage. Ce groupe contrôle est identifié comme le groupe « contrôle immergé » dans la suite de ce chapitre.

La viabilité cellulaire de chaque fibre a été quantifiée à partir des images L/D®. Sur Image J, la surface totale occupée par le signal « viabilité » a été mesurée puis le rapport de cette surface par rapport à la surface totale de la fibre a été calculé et exprimé en pourcentage. La densité surfacique de noyaux morts par unité de surface a été également calculée sur Image J (Annexe 4). Les fibres étaient considérées comme viables lorsque le signal « viabilité » occupait plus de 20 % de la surface totale de la fibre et que la densité surfacique de noyaux morts restait inférieure à 5.10^{-3} noyaux/ μm^2 . Pour cette étude, la viabilité a été étudiée après 24 h pour 30 fibres usinées, 20 contrôles support échantillon et 7 contrôles immergés.

La Figure 63 est un histogramme indiquant le pourcentage de microfibres toujours viables après 24 h pour les trois groupes étudiés : les fibres usinées, les contrôles support échantillon et les contrôles immergés.

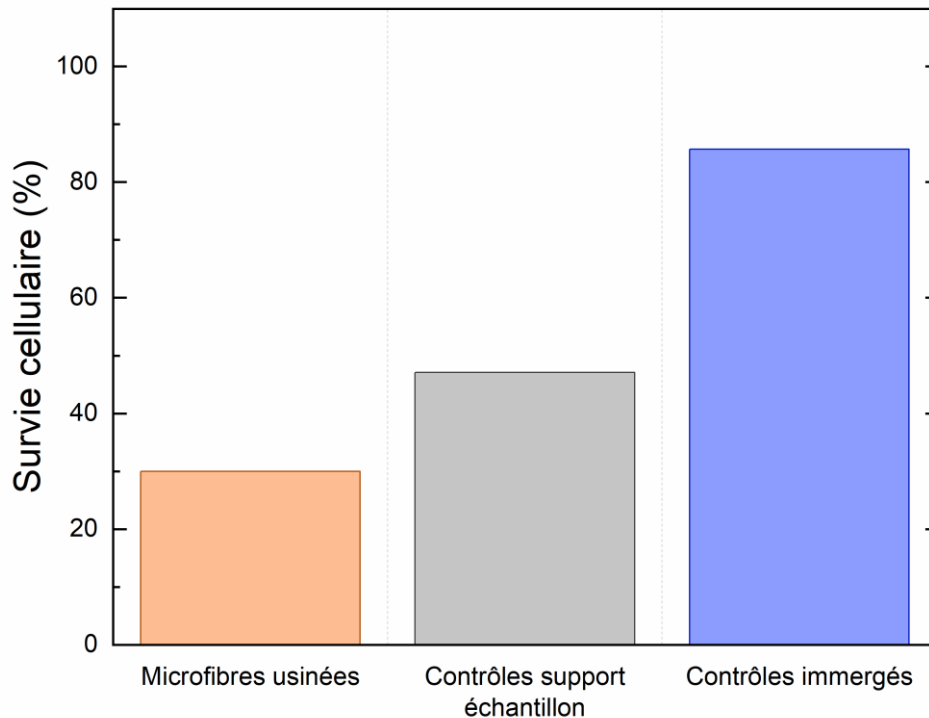


Figure 63 Histogramme montrant le pourcentage de microfibres toujours vivantes après 24 h pour le groupe des microfibres usinées, le groupe des microfibres contrôles du support échantillon et le groupe des microfibres contrôles restées immergées dans du milieu de culture.

Comme attendu, le meilleur taux de survie est celui des microfibres immergées avec 86 % de microfibres viables. Ce groupe étant conservé à 21 °C durant une journée, ces informations nous montrent que la variation de température ambiante ne semble pas avoir influencé de façon majeure les résultats.

Le pourcentage de survie descend à 47 % pour les microfibres du groupe contrôle « support échantillon ». Ce groupe a subi les mêmes variations de température que le groupe précédent mais n'ont reçu que quelques gouttes de milieu de culture pendant toute la durée de l'usinage. Le pourcentage de survie continue de descendre à 30 % pour les fibres usinées avec des conditions identiques au groupe précédent (usinage laser exclu).

Afin de comprendre l'origine de la mortalité des cellules, le taux de survie des microfibres a ensuite été étudié en fonction du temps d'usinage. Ce temps d'usinage correspond au temps que l'échantillon passe sur le support échantillon avec une faible quantité de milieu de culture. Ce temps peut être long car il permet de visualiser l'échantillon, de régler la position du point focal laser, de calculer la trajectoire laser, d'usiner la fibre et d'acquérir les images après chaque tir laser. La Figure 64 représente le pourcentage de microfibres vivantes 24 h après l'usinage en fonction de ce temps d'usinage pour le groupe de microfibres usinées et le groupe contrôle « support échantillon ».

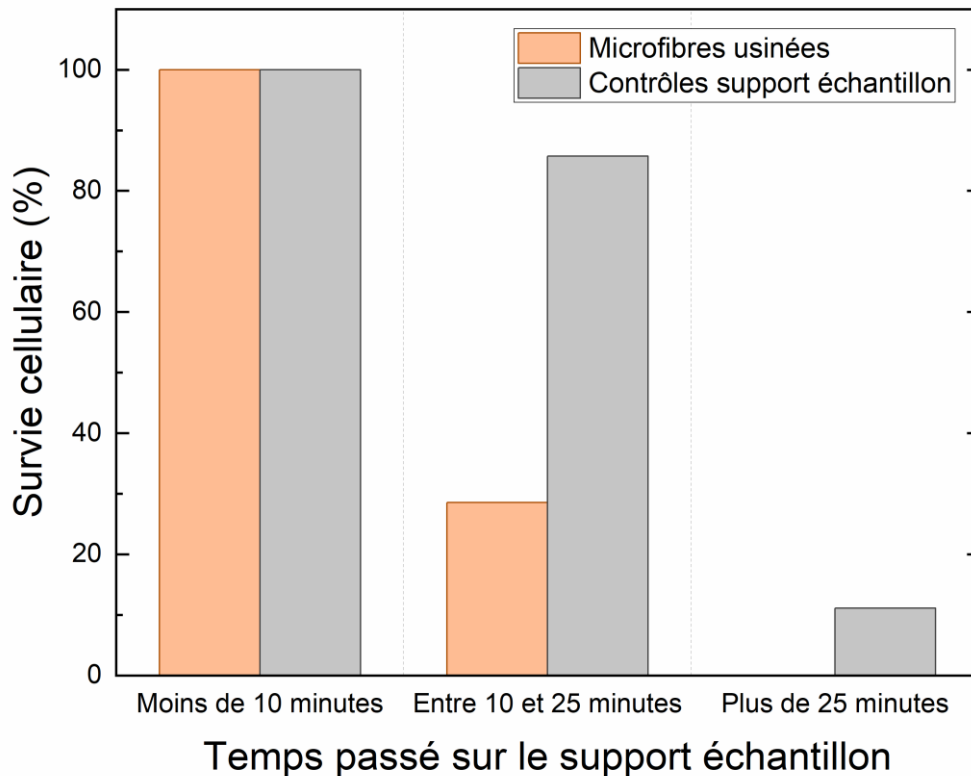


Figure 64 Histogramme montrant le pourcentage de microfibres toujours vivantes après 24h en fonction du temps passé sur le support échantillon avec une faible quantité de milieu de culture pour le groupe des microfibres usinées par laser et le groupe des microfibres contrôles du support échantillon.

La Figure 64 montre que la viabilité des cellules décroît lorsque le temps passé sur le support échantillon augmente. Ainsi, 100 % des fibres, qu'elles soient usinées ou non restent viables lorsqu'elles ont passé moins de 10 minutes sur le support. Lorsque ce temps augmente, la viabilité commence à chuter, et cette perte de viabilité est accentuée pour les fibres soumises aux impulsions lasers. Entre 10 et 25 minutes, 86 % du groupe contrôle est viable tandis que seulement 29 % des fibres usinées le sont. Au-delà de 25 minutes, toutes les fibres usinées sont mortes alors que 11 % des contrôles sont encore viables.

Ces résultats sont encourageants car ils indiquent qu'une simple diminution du temps d'usinage permet d'améliorer la viabilité cellulaire. Toutefois des nuances doivent être apportées. En effet le seuil de non-viabilité est défini lorsque le signal « viabilité » recouvre moins de 20 % de la surface totale de la fibre. Pour des temps inférieurs à 10 minutes, bien que 100 % des fibres soient considérés comme viables, certaines sont proches du seuil de non-viabilité et indiquent une diminution du nombre de cellules viables en périphérie. La Figure 65 représente deux fibres après usinage laser, une viable et une non viable avec respectivement, 20 % et 3 % de la surface de la fibre recouverte. Cette perte après usinage peut alors être diminuée en réduisant le temps de stress hydrique subi par les cellules par la réduction du temps d'usinage bien en-dessous de 10 minutes ou par l'amélioration du support échantillon.

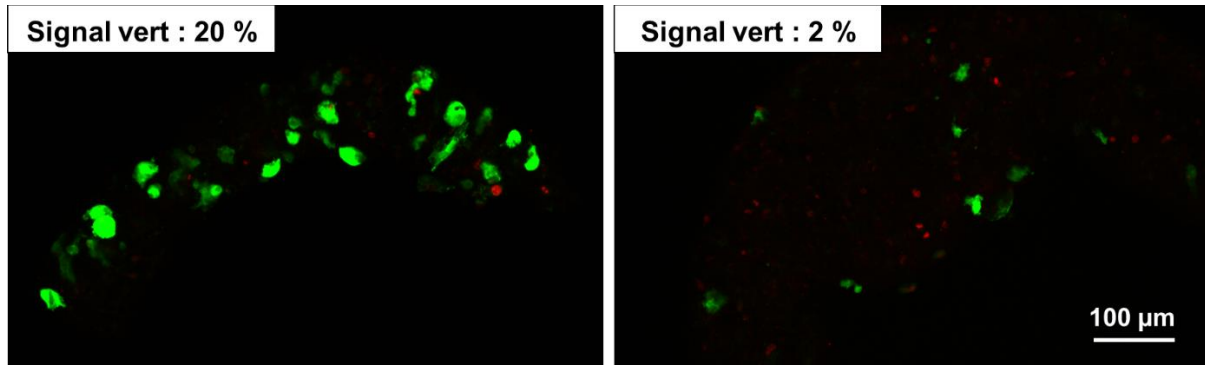


Figure 65 Images L/D® de microfibres dont le signal vert couvre 20 % et 2 % de la surface totale de la fibre.

III.2. Influence de la viabilité cellulaire sur la qualité de l'usinage laser

Nous venons de voir que la quantité d'hydratation influence la viabilité cellulaire de la fibre. Ici, nous nous intéressons à l'influence de ces changements de viabilité sur la qualité de l'usinage et la présence d'un canal. Pour rappel, aucune différence n'a été observée dans le comportement des bulles de cavitations entre les fibres hydratées ou insuffisamment hydratées. Les différences sont apparues lors de la détection des canaux 24 h après l'usinage. En effet, lorsque les fibres souffraient de déshydratation avec une perte de viabilité cellulaire, les canaux observés étaient très marqués et très fins (Figure 66 – **A**). Lorsque les fibres présentaient une viabilité cellulaire satisfaisante après l'usinage, seule une atténuation du signal rouge provenant de la matrice de collagène était détectée (Figure 66 – **B**).

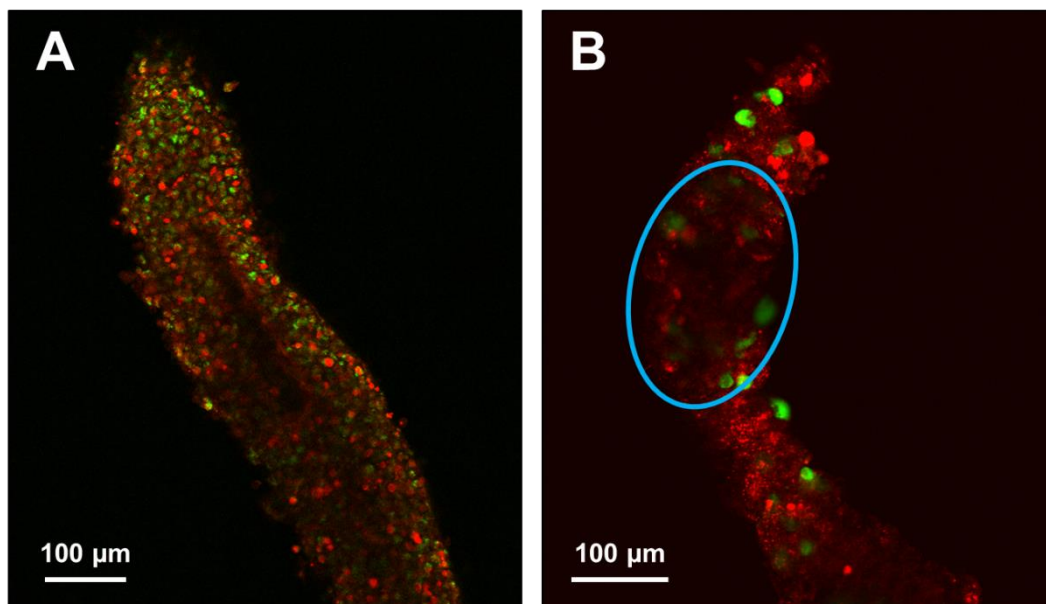


Figure 66 Différence d'interaction laser à l'intérieur de deux microfibres. A) Canal net à l'intérieur d'une fibre déshydratée après un usinage de 41 minutes. B) Atténuation de la densité de signal rouge à l'intérieur de la matrice à l'intérieur d'une fibre viable après un usinage de 9 minutes. Pour mettre en évidence la présence de perte de signal de l'image B, les couleurs L/D® ont été modifiées et un cercle bleu entoure la zone d'intérêt.

Pour les fibres déshydratées (perte de viabilité cellulaire), la présence d'un canal peut être rapidement détectée en étudiant la disparition des bulles de cavitation formées. Ainsi, la Figure 67 montre l'évolution d'une bulle de cavitation entre 2 minutes et 2 heures après le tir laser. La bulle rétrécit progressivement jusqu'à disparaître complètement 2 heures après. Lorsque la bulle rétrécit, elle laisse un canal très marqué apparaître dans son sillage. Ce canal est visible en microscopie optique. Ce mécanisme de formation d'un canal s'apparente beaucoup à l'usinage de fibres fixées au PFA 4 % réalisés pendant les travaux préliminaires où l'obtention d'un canal intravolumique dans le collagène était presque toujours systématique.

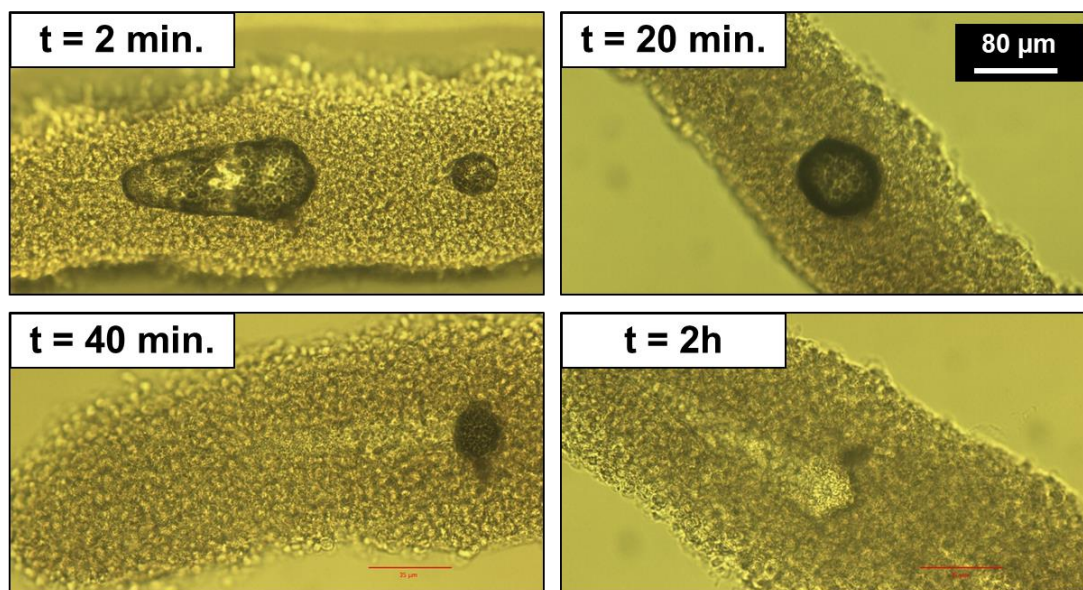


Figure 67 Evolution d'une bulle de cavitation à l'intérieur d'une microfibre après la fin de l'usinage. Les temps indiqués dans les encarts de chaque image correspondent au temps écoulé depuis la fin de l'usinage laser.

En revanche, les bulles de cavitation formées dans des fibres viables disparaissent sans laisser de traces visibles au microscope optique. Notre hypothèse est que pour des fibres usinées viables, le canal créé se referme progressivement. Contrairement à l'étude réalisée dans la gélatine où les blocs étaient remis au réfrigérateur directement après l'usinage pour régélifier l'hydrogel, l'hydrogel de collagène à l'intérieur des fibres est quant à lui replongé dans un bain de milieu de culture. Deux mécanismes peuvent alors expliquer la fermeture du canal :

- soit le collagène absorbe le liquide contenu dans le milieu de culture pour se reconstituer. Un phénomène similaire était en effet observé dans les blocs de gélatine. Après usinage laser, lorsque du liquide était rajouté à la surface des blocs de gélatine, les canaux usinés disparaissaient dans les 48 heures suivant l'usinage à 4°C,
- soit le collagène est progressivement remodelé avec l'interaction des cellules encore vivantes.

Il est probable qu'il s'agisse d'une contribution des deux phénomènes.

Afin de comprendre comment le collagène évolue à l'intérieur des microfibres viables, nous avons installé un microscope biphotonique permettant le suivi du signal de SHG du collagène de type I directement après l'usinage. Pour ces essais, une nouvelle ligne optique a été créée pour usiner et imager les fibres à partir de la même source laser directement dans le microscope biphotonique (voir chapitre II, paragraphe III.4.).

A ce jour, seul quelques essais préliminaires ont pu être réalisés avec ce dispositif expérimental. Ces premiers essais ont permis toutefois de confirmer certains résultats concernant l'hydratation des microfibres et de montrer la faisabilité du procédé sur nos échantillons.

Afin d'évaluer le comportement du collagène de type I en fonction de l'hydratation, 4 microfibres ont été usinées, dont 2 déshydratées après avoir passé 1 h sur le support échantillon et 2 suffisamment hydratées étant restées moins de 20 minutes sur le support échantillon. Les fibres ont été usinées et imagées avec les paramètres suivants :

- Paramètres d'usinage : RR = 10 kHz ; F = 19,6 J/cm² ; OL = 96,9 %, D = 60 µm et N = 4.
- Paramètres d'imagerie : RR = 10 kHz ; F = 0,18 J/cm² ; D = 60 µm

La **Figure 68** présente l'imagerie SHG de deux fibres avec des conditions d'hydratation différentes, avant et après leur usinage.

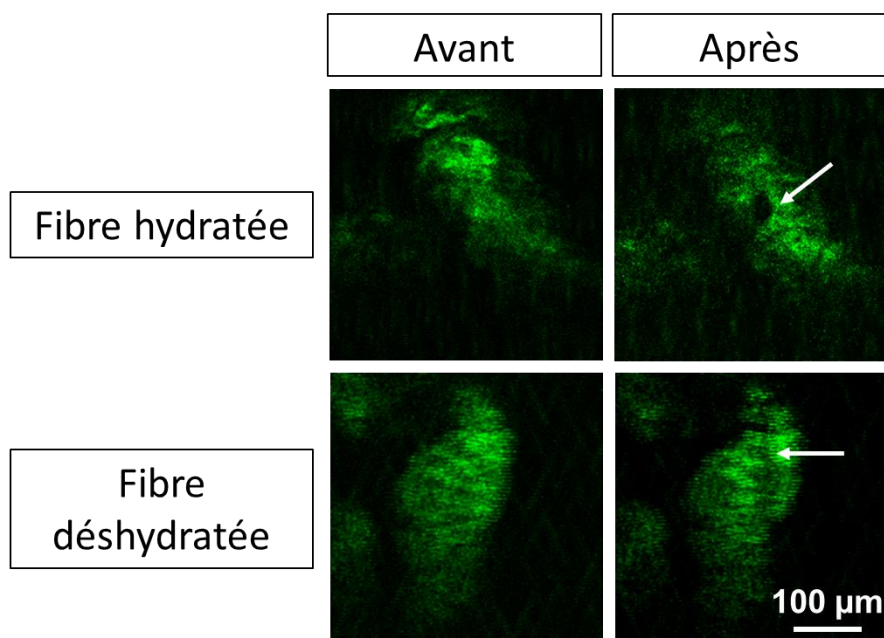


Figure 68 Signal de SHG du collagène de type I avant (à gauche) et après (à droite) l'usinage pour 2 fibres différentes. *En haut* : la fibre est restée suffisamment hydratée pour permettre la formation de bulles de cavitation (flèche blanche). *En bas* : la fibre est restée trop longtemps sur le support échantillon avant d'être usinée, une diminution nette du signal de SHG est observée le long de la trajectoire d'usinage.

Paramètres d'usinage : 1030 nm ; RR = 10 kHz ; F = 19,6 J/cm² ; OL = 96,9 % ; N = 4 ; D = 60 µm

Paramètres d'imagerie : 1030 nm ; RR = 1 MHz ; F = 0,18 J/cm² ; D = 60 µm

Pour les fibres dont l'hydratation est suffisante, on peut observer la présence de bulles de cavitation marquée par une disparition du signal de SHG sous la forme d'une tache noire localisée au niveau de la zone de tir (Figure 68, flèche blanche en haut à droite). Avant usinage, aucune perte de signal n'est observée. Pour les fibres déshydratées, l'usinage laser a créé un trait plus sombre tout le long de la trajectoire d'usinage. Contrairement à la bulle à l'intérieur de la fibre hydratée, ce trait est toujours présent 1 heure après l'usinage.

Cette première expérience confirme l'importance de l'hydratation et de la viabilité cellulaire sur la qualité d'usinage et la durabilité ou non des canaux formés. De plus, la microscopie SHG nous permet d'en apprendre un peu plus sur l'évolution des bulles de cavitation à l'intérieur des fibres viables. La **Figure 69** montre le suivi d'une bulle de cavitation pendant quelques secondes après usinage. Le temps t_0 correspond à la première image prise en SHG (juste après le changement manuel de la ligne d'usinage à la ligne d'imagerie). On y voit une bulle caractérisée par un disque noir entourant une zone de signal. Pendant les 8 secondes suivantes le diamètre de la bulle grossit et passe de $63\ \mu\text{m}$ à t_0 à $85\ \mu\text{m}$ à $t_0 + 6\ \text{s}$. Après 8 s, le grossissement de la bulle a entraîné la rupture de la paroi cellulaire, coupant la fibre en deux. Après la scission de l'échantillon, une tache noire apparaît à la place de la bulle. En parcourant l'épaisseur de l'échantillon, cette tache se retrouve sur plusieurs plans et lui confère une forme sphérique. Il peut s'agir de la formation d'une cavité apparaissant au centre de nucléation de la bulle après sa disparition. Cependant, comme l'émission du signal de SHG dépend de la grande organisation spatiale du collagène fibrillaire, il est probable que la disparition du signal soit due à la désorganisation spatiale du collagène après usinage laser c'est-à-dire, la rupture des liaisons intermoléculaires du tropocollagène et non à la formation d'une cavité.

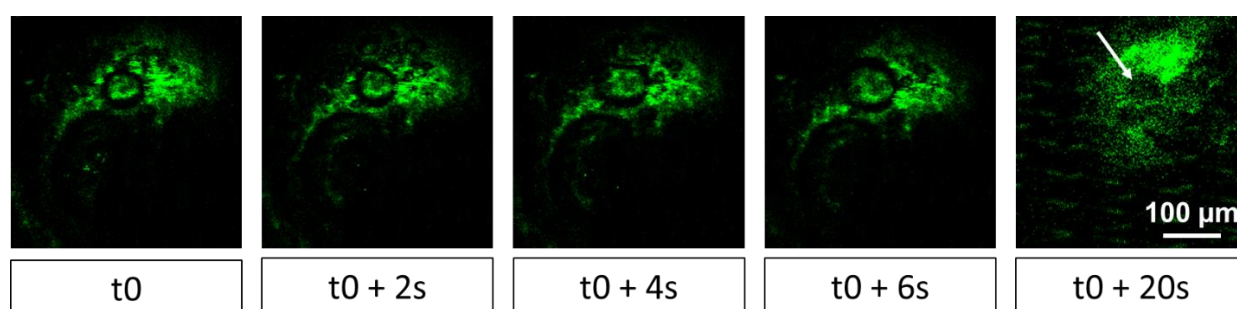


Figure 69 Signal de SHG du collagène I quelques secondes après l'usinage pour une même fibre. Pendant les 10 premières secondes, une bulle de cavitation grossit à l'intérieur du collagène. Après 10 secondes, le grossissement de la bulle a entraîné une rupture de la paroi cellulaire (non photographiée). 20 secondes après, on retrouve une atténuation du signal de collagène à l'endroit où la bulle s'est formée.

Paramètres d'usinage : $1030\ \text{nm}$; $\text{RR} = 10\ \text{kHz}$; $F = 19,6\ \text{J}/\text{cm}^2$; $\text{OL} = 96,9\ \%$; $N = 4$ passages ; $D = 60\ \mu\text{m}$.

Paramètres d'imagerie : $1030\ \text{nm}$; $\text{RR} = 1\ \text{MHz}$; $F = 0,18\ \text{J}/\text{cm}^2$; $D = 60\ \mu\text{m}$

Il serait intéressant de répéter ces essais afin d'observer ce qu'il advient de la tache noire plusieurs heures après l'usinage et de compléter les résultats obtenus avec l'imagerie au microscope confocal. Nous pourrions ainsi savoir si la disparition d'une bulle génère une cavité

au centre de nucléation, ou au contraire, si le collagène se referme mais perd totalement ces propriétés de génération du signal de seconde harmonique.

Enfin, une cinétique d'évolution des bulles de cavitation pourrait être réalisée en fonction de plusieurs paramètres laser comme la fluence ou le taux de recouvrement.

III.3. Influence de l'épaisseur des fibres sur l'usinage laser

L'interaction laser-matière dépend aussi bien des paramètres lasers utilisés que de l'échantillon. Or, il existe des différences parmi les échantillons usinés, notamment au niveau de l'indice de contraction. Comme nous l'avons mentionné au chapitre II, paragraphe II.2.1., certaines fibres peuvent se contracter au cours du temps. Leur longueur diminue alors que leur épaisseur augmente. Une fibre fortement contractée acquiert progressivement une forme sphérique, ses caractéristiques cellulaires se modifient et la couche cellulaire devient plus dense qu'une fibre faiblement contractée. Son diamètre est supérieur à 250 μm . Ces fibres fortement contractées ont été usinées pour voir l'influence d'une forte contraction sur l'usinage. Cependant, il s'est avéré très difficile d'usiner l'intérieur de la fibre sans impacter la couche cellulaire externe en raison de la forte épaisseur de la couche cellulaire. Ces fibres ont donc servi uniquement de contrôle support échantillon ou de contrôle immergé.

Pour les fibres d'épaisseur inférieure à 250 μm , l'influence de l'épaisseur sur la présence d'un canal dans le cœur de collagène est résumée sur le Tableau 8. 44 fibres ont été usinées pour cette analyse.

Tableau 8 : Répartition du nombre de fibres usinées selon la présence ou l'absence d'une interaction laser après usinage et en fonction du diamètre de la microfibre.

	140 – 160 μm	160 – 200 μm	200 – 240 μm
Nombre de fibres avec interaction laser	11	12	6
Nombre de fibres sans interaction laser	7	6	2

Pour les fibres dont le diamètre oscille entre 140 et 200 μm , la présence d'un canal laser ne semble pas dépendre de la variation du diamètre. Plus particulièrement, 61 % des fibres de diamètre entre 140 et 160 μm présentent des canaux lasers avec ou sans dommage cellulaire. Pour les fibres de diamètre entre 160 et 200 μm ce nombre est de 65 %, ce qui correspond à seulement une fibre de plus par rapport à la catégorie précédente. Pour un diamètre supérieur à 200 μm , le nombre d'échantillons n'est pas suffisant pour observer une réelle tendance.

L'absence de corrélation entre l'épaisseur des fibres et la présence d'un canal laser semble indiquer que pour des fibres de diamètre inférieur à 250 μm , l'indice de contraction n'influe pas sur l'usinage laser.

IV. Discussion

La génération d'un canal intravolumique dans le cœur de microfibres vivantes a apporté de nouveaux challenges avec notamment le besoin de maintenir la viabilité des cellules, de préserver la structure de la paroi cellulaire et de conserver le canal usiné.

Dans ce but, les paramètres laser ont été optimisés en s'inspirant des résultats obtenus avec le modèle de gélatine. L'étude précédente avait en effet démontré que la génération d'un canal était favorisée par la formation de bulles de cavitation volumineuses (largeur de 77 μm en moyenne) avec une durée de vie de quelques minutes à 1 ou 2 heures. Ces bulles étaient générées à une profondeur de 100 μm et une fluence $F = 24,5 \text{ J/cm}^2$, une cadence de 10 kHz et un fort recouvrement $OL = 98,5 \%$ après 5 passages laser. Toutefois, pour des fibres dont le diamètre est de 200 μm en moyenne, la génération de bulles volumineuses ou localisées trop près de la paroi cellulaire peut engendrer une pression mécanique sur les cellules à l'origine d'une perte de viabilité cellulaire ou d'une destruction de la structure de la fibre. Pour préserver la viabilité cellulaire, l'usinage des fibres a donc été adapté à la structure spécifique des microfibres.

L'usinage des microfibres peut être optimisé lorsque le point focal laser est centré à l'intérieur de la fibre à 100 μm de profondeur. Cette profondeur permet d'éloigner au maximum les bulles de cavitation de la paroi cellulaire tout en minimisant la fluence au niveau de la paroi cellulaire. En effet, comme le montre le schéma de la Figure 70, la valeur de la fluence diminue en s'éloignant du point focal. Si le point focal est trop près de la paroi, alors des effets non linéaires peuvent apparaître au niveau des cellules et engendrer une perte de viabilité voire la destruction de la structure de la fibre. De plus, pour des profondeurs supérieures à 100 μm , il est probable qu'une partie de l'énergie laser soit absorbée et dispersée par le collagène riche en eau, ce qui diminue le volume des bulles de cavitation formée et la probabilité d'observer un canal à l'intérieur des microfibres.

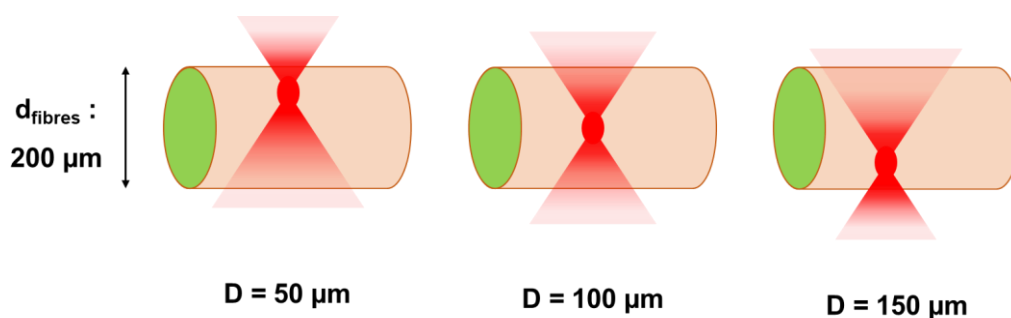


Figure 70 Schéma illustrant les différentes profondeurs d'usinage pour une microfibre de 200 µm de diamètre. Le cône rouge dégradé schématise la valeur de la fluence avant et après focalisation. Plus on s'éloigne du centre de focalisation, plus la fluence diminue.

Une fois le volume focal centré, la variation de la fluence au point de focalisation permet de moduler le volume des bulles formées et leur durée de vie. Alors qu'une fluence trop faible ne permet pas de générer des bulles de cavitation suffisamment volumineuses pour générer un canal, une fluence trop élevée engendre des effets non linéaires directement sur la paroi des microfibrilles. En effet, lorsque la fluence est augmentée au point focal, elle augmente également dans tout le cône de focalisation. Au-delà de 36,8 J/cm², la fluence arrivant sur la paroi cellulaire dépasse probablement le seuil de dommage cellulaire et altère toutes les cellules présentes sur la trajectoire laser. La fluence optimale semble osciller entre 22,1 J/cm² et 24,5 J/cm². Sa valeur est influencée par les propriétés propres des fibres tels que la contraction ou le taux d'hydratation.

Lors de l'usinage, l'utilisation d'un second passage laser (voire plus) permet d'augmenter le volume des bulles formées lors du premier passage, de prolonger leur durée de vie ou d'en créer de nouvelles. D'après l'étude sur la gélatine, l'augmentation de N pourrait ainsi favoriser la formation d'un canal intravolumique à l'intérieur de l'hydrogel par accumulation thermique. Cependant, l'étude constatait également que l'augmentation de N augmentait la présence de dégâts thermiques, notamment de craquelures, autour de la zone irradiée et pouvait altérer les cellules, très sensibles à la chaleur. Ces hypothèses ont pu être vérifiées sur les microfibrilles cellulaires. Les données de viabilité cellulaire ont montré que le laser altère les caractéristiques cellulaires pour $N \geq 3$. Cette chute de la viabilité montre que l'accumulation thermique causée par l'augmentation du nombre de passage est délétère pour les cellules, bien qu'il favorise la génération de canaux intravolumiques. Pour préserver la viabilité cellulaire, un seul passage laser serait conseillé contrairement aux 5 passages laser réalisés à l'intérieur de la gélatine. Le recours à un second passage pourrait permettre, au besoin, de prolonger la durée de vie des bulles de cavitation et d'augmenter leur volume pour favoriser la formation d'un canal dans les cas où le premier passage laser n'aurait pas permis d'obtenir des bulles satisfaisantes.

La dose énergétique joue un rôle important à la fois dans le comportement des bulles de cavitation et dans les dégâts observés sur la paroi cellulaire. Selon l'étude réalisée avec la gélatine, une faible cadence (10 kHz) combinée avec un taux de recouvrement élevée ($\geq 98,5\%$) permettait de convertir majoritairement l'énergie laser sous forme d'énergie mécanique de cavitation plutôt que d'être dissipée sous forme d'énergie thermique. Dans ces conditions, le laser induit la formation de bulles de cavitation de gros volume mettant de plusieurs minutes à 1 ou 2 heures pour se résorber et favorisant la formation d'un canal. A 50 kHz, au contraire, l'énergie laser serait majoritairement dispersée sous forme de chaleur plutôt que convertie en énergie mécanique. Dans ces conditions les bulles formées sont plus petites et transitoires. Les résultats obtenus avec les fibres semblent aller dans ce sens mais l'impact au niveau des cellules diffère. Ainsi, à 10 kHz, les dégâts sont majoritairement d'origine mécanique. La pression exercée par l'expansion des bulles de cavitation engendrerait la mort d'une partie des cellules réparties sur l'ensemble de la surface cellulaire usinée, tandis qu'à 50 kHz, les dégâts seraient majoritairement d'origine thermique. Dans ce cas, les cellules situées sur la trajectoire du faisceau laser accumuleraient de la chaleur aboutissant à la mort cellulaire.

Jouer sur le taux de recouvrement peut alors permettre de moduler le volume des bulles formées pour limiter la pression mécanique exercée sur les cellules lors de l'expansion des bulles de cavitation. Pour 10 kHz, et une fluence $F = 24,5 \text{ J/cm}^2$, la valeur seuil du recouvrement pour laquelle plus de 50 % des microfibres affichent une perte cellulaire significative semble osciller autour de $OL = 98,5\%$. Un taux de recouvrement plus faible de (96,9 %) peut donc être conseillé pour préserver la viabilité mais en maintenant les chances d'obtenir un canal.

Après optimisation des paramètres laser, on constate encore une perte de la viabilité cellulaire. Cette perte est due à la fois à l'usinage laser et à la fois à un manque d'hydratation des échantillons durant l'usinage. Le support échantillon a été choisi pour restreindre la quantité de milieu de culture afin de diminuer la dispersion de l'énergie laser pendant l'usinage tout en maintenant les fibres suffisamment hydratées pour former des bulles de cavitation à l'intérieur de l'hydrogel. Ce support échantillon minimise les dégâts cellulaires pendant 10 minutes. Au-delà, la viabilité cellulaire est altérée. Toutefois, une perte de viabilité est encore observée en dessous de 10 minutes et pourrait être réduite en améliorant le support échantillon ou en raccourcissant le temps d'usinage. Ce temps peut être réduit en automatisant par exemple la détection des contours de la fibre, le calcul de la trajectoire laser et le positionnement du point focal dans le cœur de la fibre. La réduction du temps permettrait ainsi de diminuer la sensibilité des cellules aux perturbations extérieures, et notamment favoriser la survie cellulaire lors d'un usinage laser à 10 kHz.

L'hydratation des fibres affecte également le résultat de l'usinage laser 24 heures après. Lorsque les fibres sont non viables à cause d'une hydratation insuffisante, l'usinage

laser conduit à la formation d'un canal très marqué dans le collagène desséché. Les conditions de formation de ce canal sont alors analogues à celles dans les blocs de gélatine ou à l'intérieur de fibres fixées au PFA 4 %. En revanche, lorsque les fibres sont suffisamment hydratées et par conséquent viables, la détection d'un canal est difficile et diffère fortement des résultats obtenus avec la gélatine. Dans ce cas, soit aucun canal n'est détecté, soit seule une légère atténuation du signal d'autofluorescence provenant du cœur d'hydrogel est détecté. On peut l'expliquer par le fait que le collagène est suffisamment riche en eau pour pouvoir se résorber après la disparition des bulles et par le fait que les cellules viables remodelent continuellement leur environnement et donc, le collagène. Un compromis semble ainsi difficile à trouver entre la préservation de la viabilité cellulaire et la formation d'une lumière intravolumique.

Conclusion générale

L'utilisation de laser ultracourt fortement focalisés permet aujourd'hui d'usiner avec une grande précision le volume de matériaux transparents à l'aide d'un processus non linéaire d'absorption multiphotonique. En travaillant avec une longueur d'onde proche infrarouge, ce procédé peut être adapté à l'usinage de tissus biologiques, majoritairement transparents et faiblement dispersifs à cette longueur d'onde. Dans ce contexte, l'objectif de la thèse était de créer un modèle expérimental de microcapillaires glomérulaires perfusables en trois dimensions en s'inspirant des procédés industriels d'usinage de matériaux transparents par laser femtoseconde. Ainsi, une microfibre constituée d'un cœur d'hydrogel de collagène et d'une paroi externe bicellulaire était fabriquée en amont avant d'être usinée par laser pour générer une lumière dans le cœur de la fibre. La génération de canaux intravolumiques à l'intérieur d'hydrogel synthétique est aujourd'hui majoritairement étudiée afin de proposer des modèles d'études de vascularisation *in vitro*. Cependant, l'originalité de ce travail repose sur l'utilisation de lasers femtosecondes industriels pour usiner un hydrogel naturel de collagène situé derrière une couche de cellules denses. L'étude s'est effectuée en deux temps. Tout d'abord, les paramètres d'usinage laser ont été optimisés pour permettre la création d'un canal à l'intérieur d'un modèle, constitué d'un hydrogel de gélatine, dérivé du collagène. Dans un second temps, l'étude paramétrique a été adaptée sur les microfibres cellulaires en tenant compte de l'impact de l'usinage sur la paroi externe des microfibres et sur la viabilité cellulaire.

Le modèle de gélatine a permis de démontrer que la génération de grosses bulles de cavitation (77 μm de largeur en moyenne), peu nombreuses et d'une durée de vie de plusieurs minutes à 1 ou 2 heures favorisait la formation d'un canal intravolumique à l'intérieur de l'hydrogel. Ces bulles étaient générées pour une profondeur **$D = 100 \mu\text{m}$** , une fluence **$F = 24,5 \text{ J/cm}^2$** , un nombre de passages laser **$N = 5$** , une cadence **$RR = 10 \text{ kHz}$** et un taux de recouvrement **$OL = 98,5 \%$** . Ces résultats sur gélatine ont permis d'optimiser en amont les paramètres laser avant d'usiner les microfibres, pour lesquelles il était difficile de produire un nombre d'échantillon suffisant pour réaliser une étude paramétrique consistante. L'étude réalisée sur les microfibres de collagène avec cellules a montré que le comportement des bulles de cavitation était analogue à l'intérieur du collagène. Cependant, la génération de bulles trop volumineuses peut entraîner des dommages cellulaires au niveau de la paroi externe. Ainsi, les paramètres optimaux sont une profondeur **$D = 100 \mu\text{m}$** , une fluence oscillant entre **$F = 22,1 \text{ J/cm}^2$** et **$F = 24,5 \text{ J/cm}^2$** , un nombre de passages limité à **$N = 2$** , une cadence **$RR = 10 \text{ kHz}$** et un taux de recouvrement **$OL = 96,9 \%$** . Afin de préserver la viabilité cellulaire 24 heures après l'usinage, les microfibres doivent passer un temps inférieur à 10 minutes sur le support échantillon recouvert d'agarose avec un apport minimal en milieu de culture. Cependant, dans ces conditions, la détection d'un canal intravolumique n'est pas

systématique. En effet, lorsque les cellules sont viables après l'usinage, seule une diminution de la densité de matière dans le cœur des fibres est observée. Contrairement à la gélatine, le nombre de passages laser limité à $N = 1$ ou $N = 2$ et le taux de recouvrement restreint à $OL = 96,9 \%$ est nécessaire pour préserver la viabilité cellulaire mais semble compromettre la formation d'un canal intravolumique. Ainsi, un compromis entre préserver la viabilité cellulaire et former un canal intravolumique durable reste à trouver.

Perspectives

La première difficulté rencontrée pendant ces travaux et à ce jour, non-résolue, est la contraction des microfibres avant usinage laser. Lorsque les fibres sont contractées, leurs caractéristiques morphologiques changent et les fibres ne sont plus usinables par laser. Il est probable que les types cellulaires utilisés dans le processus de fabrication, et notamment les podocytes, favorisent ce phénomène, bien qu'il ne s'agisse pas du seul facteur causal. Ainsi, en changeant le type de cellules utilisées, le procédé serait très certainement plus reproductible mais l'application finale en serait modifiée. Pour cette application, l'étude des facteurs influençant la contraction cellulaire doit donc être approfondie afin de conserver les caractéristiques morphologiques des microfibres dans le temps et d'améliorer la reproductibilité du processus de fabrication. Cette amélioration nous permettrait d'augmenter le nombre d'échantillon fabriqué et de tester plus de paramètres lasers directement à l'intérieur des microfibres cellularisées.

Le deuxième point concerne la difficulté de trouver des conditions d'usinage laser permettant de préserver la viabilité cellulaire sans compromettre la formation d'un canal permanent. Pour créer un canal durable dans le temps, il pourrait alors être intéressant de perfuser la microfibre dans les quelques heures suivant l'usinage, lorsque les bulles de cavitation sont encore à l'intérieur de l'hydrogel. Dans le cadre du projet, nous prévoyons le développement d'un système de microperfusion adapté aux microfibres, en collaboration avec le Pr. Houiller de l'unité INSERM U872 afin de perfuser les microfibres. Le système de microperfusion pourrait permettre tout d'abord de maintenir le canal issu des bulles de cavitation formées par laser et de vérifier leur étanchéité après usinage laser.

Le dernier axe d'amélioration envisagé serait de réaliser la fabrication des microfibres, leur usinage et leur caractérisation au sein du même environnement. On pourrait ainsi limiter les risques de contamination, supprimer les dommages cellulaires dus au transport des échantillons, minimiser la perte de viabilité cellulaire due à des temps prolongés passés en dehors de l'incubateur et avec une faible quantité d'hydratation tout en réduisant le temps total du procédé de fabrication.

Finalement, une fois que la lumière centrale sera obtenue et les microfibres perfusées, les caractéristiques cellulaires devront être de nouveau contrôlées et comparées à des fibres non perfusées afin d'évaluer l'impact de la perfusion sur la morphologie, le phénotype cellulaires et le remodelage de la matrice extracellulaire. Cette étude pourra s'effectuer à l'aide de techniques d'immunofluorescence, microscopie électronique, Western Blot et PCR.

A long terme, on pourra envisager, l'utilisation de cette microfibre pour l'étude expérimentale des mécanismes de physiopathologies glomérulaires et lors de la conception de nouveaux médicaments via l'injection de substances pathogènes ou desdits médicaments.

ANNEXES

<i>Annexe 1. G-Code pour l'usinage de la gélatine.....</i>	<i>164</i>
<i>Annexe 2. Macro pour mesurer la largeur des zones modifiées par laser sous Image J.....</i>	<i>165</i>
<i>Annexe 3. G-Code pour l'usinage des microfibres</i>	<i>167</i>
<i>Annexe 4. Macro pour calculer le pourcentage surfacique occupé par le signal « Live » et la densité de noyaux « Dead » par unité de surface sous Image J.....</i>	<i>168</i>

Annexe 1. G-Code pour l'usinage de la gélatine

Exemple de G-Code permettant de réaliser un trait laser de 500 μm selon x dans le volume d'un bloc de gélatine à **100 μm de profondeur** depuis la surface, pour une vitesse de **1 mm/s** avec **5 passages** laser.

```
G92 X0 Y0 Z0          // Initialisation des coordonnées de position des platines en x, y et z

F1                     //Vitesse de déplacement des platines fixées à 1 mm/s

G91 Z-0.100           // Déplacement à 100  $\mu\text{m}$  de profondeur par rapport à la surface
G4 X0.01

P777 = 0               //Initialisation de la boucle WHILE

WHILE(P777<5){         //Boucle WHILE limitant le nombre de passages laser à 5

  G91 X-0.5            //Déplacement de 500  $\mu\text{m}$  selon -x
  G4 X0.01

  G91 X0.5             //Déplacement de 500  $\mu\text{m}$  selon +x (prise d'élan pour permettre
  G4 X0.01             //au platines d'atteindre la vitesse réelle de 1 mm/s au moment de
                      //l'usinage)

  M60                  //Shutter laser ouvert

  G91 X0.5             //Usinage : Déplacement de 500  $\mu\text{m}$  selon +x avec laser enclenché
  G4 X0.01

  M61                  //Shutter laser fermé

  G91 X0.5             //Déplacement de 500  $\mu\text{m}$  selon +x (pour empêcher la
  G4 X0.01             //décélération des platines pendant l'usinage)

  G91 X-1              //Retour à la position d'origine en x
  G4 X0.01

  P777 = P777 + 1

}

P777 = 0

G91 Y0.2              //Déplacement de 200  $\mu\text{m}$  selon +y pour le prochain usinage laser
G4 X0.01

M2                     //Fin du G-Code
```

Annexe 2. Macro pour mesurer la largeur des zones modifiées par laser sous Image J

Macro permettant de récupérer la largeur maximale, minimale et moyenne de la zone modifiée par laser dans les blocs de gélatine. En fonction de la qualité du masque renvoyé à la fin de la fonction preprocess(), un second traitement manuel pouvait être effectué. Avant chaque traitement, et en fonction du grossissement utilisé lors de la prise d'image, une valeur de pixel était associée à une valeur en μm .

```
preprocess();
halloween();
analyze();
```

```
// Réaliser le pré-traitement de l'image
```

```
function preprocess(){
    run("Duplicate...", "title=a_traiter.tif");
    selectWindow("a_traiter.tif");
    run("8-bit");
    run("Convolve...", "text1=[1 1 1 1 1 1\n] normalize");
    run("Subtract Background...", "rolling=500");
    setAutoThreshold("Triangle dark");
    setOption("BlackBackground", true);
    run("Convert to Mask");
    run("Analyze Particles...", "size=50-Infinity pixel show=Masks include");
    rename("Mask");
}
```

```
//Créer la carte des distances et créer le squelette permettant de tracer un profil d'intensité évoluant
en fonction de la distance du centre du canal laser vers le bord externe de la zone modifiée.
```

```
function halloween(){
    run("Duplicate...", "title=EDM");
    run("Duplicate...", "title=Skeleton");
    selectWindow("EDM");
    run("Invert");
    run("Distance Map");
    run("Multiply...", "value=2");
    selectWindow("Skeleton");
    run("Invert");
    run("Skeletonize");
    run("Invert");
    run("Analyze Skeleton (2D/3D)", "prune=[shortest branch] prune_0");
    roiManager("Reset");
    run("Analyze Particles...", "size=0-Infinity circularity=0-0.5 show=Nothing add");
}
```

```
// Mesurer la largeur minimale, maximale et moyenne de la zone modifiée par laser ainsi que la
déviation standard et la renvoyer sous forme de tableau
```

```
function analyze(){
    minArray=newArray(roiManager("Count"));
```

```

maxArray=newArray(roiManager("Count"));
meanArray=newArray(roiManager("Count"));
stdArray=newArray(roiManager("Count"));

for(i=0; i<roiManager("Count"); i++){
    selectWindow("EDM");
    roiManager("Select", i);
    run("Area to Line");
    run("Plot Profile");
    Plot.getValues(xpoints, ypoints);
    Array.getStatistics(ypoints, minArray[i], maxArray[i], meanArray[i], stdArray[i]);
}

run("Clear Results");

Table.setColumn("Min", minArray);
Table.setColumn("Max", maxArray);
Table.setColumn("Mean", meanArray);
Table.setColumn("Std", stdArray);
}

```

Annexe 3. G-Code pour l'usinage des microfibres

Ce code permet d'effectuer un trait laser à l'intérieur d'une microfibre à une profondeur de 90 μm , avec un seul passage laser et une vitesse de déplacement des platines de 0,5 mm/s. La trajectoire du trait laser est codée selon la disposition de la fibre dans l'espace. Après avoir réalisé un trait laser, le réticule de visée est déplacée en x et y au début de la prochaine trajectoire et une nouvelle trajectoire est codée puis exécutée. Pour effectuer un second passage laser, le G-code doit être relancé.

G92 X0 Y0 Z0	// Initialisation des coordonnées de position des platines en x, y et z
F0.5	// Vitesse de déplacement des platines fixées à 0,5 mm/s
G91 Z0.090 G4 X0.01	// Déplacement à 90 μm de profondeur par rapport à la surface
M60	// Shutter laser ouvert
G91 X0.025 Y-0.209 G4 X0.01	// Usinage : Déplacement des platines de 25 μm selon +x et de // 209 μm selon -y pour usiner un bout d'une microfibre
M61	// Shutter laser fermé
G91 X-0.025 Y0.209 G4 X0.01	// Retour à la position d'origine
G91 Z-0.060 G4 X0.01	// Retour à la surface de la fibre pour évaluer les dommages au // niveau de la paroi cellulaire
M2	// Fin du G-Code

Annexe 4. Macro pour calculer le pourcentage surfacique occupé par le signal « Live » et la densité de noyaux « Dead » par unité de surface sous Image J

```
// Préréglage : Séparation des signaux verts et rouges et projection en Z
// L'analyse des signaux verts et rouges s'est effectuée sur la projection en Z des maximums
d'intensités de chacune des coupes selon Z

run("Duplicate...", "title=Live_Dead.tif");
selectWindow("Live_Dead");
run("Split Channels"); // Séparation des canaux
selectWindow("C1-Live_Dead");
rename("Dead");
run("Z Project...", "projection=[Max Intensity]"); // Projection MAX en Z sur le Dead
selectWindow("C2-Live_Dead");
rename("Live");
run("Z Project...", "projection=[Max Intensity]"); // Projection MAX en Z sur le Live

// La mesure renvoie l'aire, l'intensité minimale, maximale et moyenne de chacune des zones
sélectionnées
run("Set Measurements...", "area mean limit display redirect=None decimal=2");

// Mesure de la surface totale de la fibre
// La surface totale est calculée à partir des contours de la fibre détectés avec le signal vert
provenant du cytoplasme des cellules de la couche externe des microfibres

selectWindow("MAX_Live")
setAutoThreshold("MinError dark");
run("Analyze Particles...", " show=Masks");
run("Close-");
run("Fill Holes");
setOption("BlackBackground", false);
run("Erode");
run("Create Selection");
selectWindow("MAX_Live");
run("Restore Selection");
run("Measure");
selectWindow("Mask of MAX_Live");
close();

// Analyse du vert avec endothélium continu, seuillage avec technique de Li

selectWindow("MAX_Live");
setAutoThreshold("Li dark");
run("Measure");

// Analyse du vert avec noyaux disjoints, seuillage avec technique de Li
// Renvoie le nombre de cellules distinctes et la surface et l'intensité moyenne de chaque cellule
```

```

selectWindow("MAX_Live");
run("Select All");
setAutoThreshold("Li dark");
run("Analyze Particles...", "size=20-Infinity show=Masks display clear summarize");

// Analyse du vert pycnotique, seuillage avec technique de Shanbhag + ligne de partage des eaux
// Renvoie le nombre de cellules distinctes et la surface et l'intensité moyenne de chaque cellule

selectWindow("MAX_Live");
run("Select All");
setAutoThreshold("Shanbhag dark");
run("Analyze Particles...", "size=20-Infinity show=Masks");
run("Set Measurements...", "area mean limit display redirect=[MAX_Live] decimal=2");
selectWindow("Mask of MAX_Live");
run("Watershed");
run("Analyze Particles...", "size=20-Infinity show=Masks display clear summarize");

// Analyse du rouge, seuillage avec technique de RenyiEntropy

selectWindow("Dead");
run("Z Project...", "projection=[Max Intensity]");
setAutoThreshold("RenyiEntropy dark");
run("Measure");
selectWindow("MAX_Dead");
run("Analyze Particles...", "size=10-Infinity show=Masks display clear summarize");

```

Références

1. Agence de la biomédecine (2016) Rapport R.E.I.N. In: Rapp. Réseau Epidémiologique Inf. en Néphrologie. <https://www.agence-biomedecine.fr/R-E-I-N-Reseau-Epidemiologique-et-Information-en-Nephrologie>
2. Abouna GM (2008) Organ Shortage Crisis: Problems and Possible Solutions. *Transplant Proc.* <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2007.11.067>
3. Deen WM, Lazzara MJ, Myers BD (2017) Structural determinants of glomerular permeability. *Am J Physiol Physiol* 281:F579–F596. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.2001.281.4.f579>
4. Satchell S (2013) The role of the glomerular endothelium in albumin handling. *Nat Rev Nephrol* 9:717–725. <https://doi.org/10.1038/nrneph.2013.197>
5. Miner JH (1999) Renal basement membrane components. *Kidney Int* 56:2016–2024. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.1999.00785.x>
6. Ronco P, Chatziantoniou C, Monteiro R (2017) Insuffisance rénale - Décrypter les mécanismes de destruction du rein. In: INSERM. <https://www.inserm.fr/information-en-sante/dossiers-information/insuffisance-renale>
7. Fondation du rein La dialyse. In: Fond. du rein. <https://www.fondation-du-rein.org/quest-ce-que-la-dialyse/>
8. Eddy AA, López-Guisa JM, Okamura DM, Yamaguchi I (2012) Investigating mechanisms of chronic kidney disease in mouse models. *Pediatr Nephrol* 27:1233–1247. <https://doi.org/10.1007/s00467-011-1938-2>
9. Muhammad S (2014) Nephrotoxic nephritis and glomerulonephritis: Animal model versus human disease. *Br J Biomed Sci* 71:168–171. <https://doi.org/10.1080/09674845.2014.11669982>
10. Becker GJ, Hewitson TD (2013) Animal models of chronic kidney disease: Useful but not perfect. *Nephrol Dial Transplant* 28:2432–2438. <https://doi.org/10.1093/ndt/gft071>
11. Hilgendorf C, Ahlin G, Seithel A, et al (2007) Expression of Thirty-six Drug Transporter Genes in Human. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 35:1333–1340. <https://doi.org/10.1124/dmd.107.014902.ularly>
12. Eremina V, Baelde HJ, Quaggin SE (2007) Role of the VEGF-A signaling pathway in the glomerulus: Evidence for crosstalk between components of the glomerular filtration barrier. *Nephron - Physiol* 106:. <https://doi.org/10.1159/000101798>
13. Tasnim F, Zink D (2012) Cross talk between primary human renal tubular cells and endothelial cells in cocultures. *Am J Physiol Physiol* 302:F1055–F1062. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00621.2011>
14. Yang SH, Choi JW, Huh D, et al (2017) Roles of fluid shear stress and retinoic acid in the differentiation of primary cultured human podocytes. *Exp Cell Res* 354:48–56. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2017.03.026>
15. Jang KJ, Mehr AP, Hamilton GA, et al (2013) Human kidney proximal tubule-on-a-chip for drug transport and nephrotoxicity assessment. *Integr Biol (United Kingdom)* 5:1119–1129. <https://doi.org/10.1039/c3ib40049b>

16. Wang P-C, Takezawa T (2005) Reconstruction of renal glomerular tissue using collagen vitrigel scaffold. *J Biosci Bioeng*. <https://doi.org/10.1263/jbb.99.529>
17. Pampaloni F, Reynaud EG, Stelzer EHK (2007) The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. *Nat Rev 8*:. <https://doi.org/10.1038/nrm2236>
18. Joraku A, Stern KA, Atala A, Yoo JJ (2009) In vitro generation of three-dimensional renal structures. *Methods*. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2008.09.005>
19. Langer R, Vacanti J (2016) Advances in tissue engineering. *J Pediatr Surg* 51:8–12. <https://doi.org/10.1109/TBME.2017.2684244>
20. Kumar VA, Brewster LP, Caves JM, Chaikof EL (2011) Tissue Engineering of Blood Vessels: Functional Requirements, Progress, and Future Challenges. *Cardiovasc Eng Technol* 2:137–148. <https://doi.org/10.1007/s13239-011-0049-3>
21. Priya SG, Jungvid H, Kumar A (2008) Skin Tissue Engineering for Tissue Repair and Regeneration. *Tissue Eng Part B Rev* 14:105–118. <https://doi.org/10.1089/teb.2007.0318>
22. Atala A, Bauer SB, Soker S, et al (2006) Tissue-engineered autologous bladders for patients needing cystoplasty. *Lancet* 367:1241–1246. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(06\)68438-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(06)68438-9)
23. Badylak SF, Nerem RM (2010) Progress in tissue engineering and regenerative medicine. *Proc Natl Acad Sci* 107:3285–3286. <https://doi.org/10.1073/pnas.1000256107>
24. Larousse Médical Définition Vascularisation. <https://www.larousse.fr/encyclopedie/medical/vascularisation/16864>
25. Novosel EC, Kleinhans C, Kluger PJ (2011) Vascularization is the key challenge in tissue engineering. *Adv. Drug Deliv. Rev.*
26. Frerich B, Lindemann N, Kurtz-Hoffmann J, Oertel K (2001) In vitro model of a vascular stroma for the engineering of vascularized tissues. *Int J Oral Maxillofac Surg* 30:414–420. <https://doi.org/10.1054/ijom.2001.0130>
27. Margaritis A, Wallace JB (1984) Novel bioreactor systems and their applications. *Bio/Technology* 2:447–453. <https://doi.org/10.1038/nbt0584-447>
28. Lalan S, Pomerantseva I, Vacanti JP (2001) Tissue engineering and its potential impact on surgery. *World J Surg* 25:1458–1466. <https://doi.org/10.1007/s00268-001-0131-3>
29. Folkman J, D'Amore PA (1996) Blood vessel formation: What is its molecular basis? *Cell* 87:1153–1155. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81810-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81810-3)
30. Soker S, Machado M, Atala A (2000) Systems for therapeutic angiogenesis in tissue engineering. *World J Urol* 18:10–18. <https://doi.org/10.1007/PL00007070>
31. You F, Wu X, Zhu N, et al (2016) 3D Printing of Porous Cell-Laden Hydrogel Constructs for Potential Applications in Cartilage Tissue Engineering. *ACS Biomater Sci Eng* 2:1200–1210. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.6b00258>
32. Izadifar Z, Chang T, Kulyk W, et al (2016) Analyzing biological performance of 3D-printed, cell-impregnated hybrid constructs for cartilage tissue engineering. *Tissue Eng - Part C Methods* 22:173–188. <https://doi.org/10.1089/ten.tec.2015.0307>
33. Naghieh S, Karamooz-Ravari MR, Sarker MD, et al (2018) Influence of crosslinking on the mechanical behavior of 3D printed alginate scaffolds: Experimental and numerical approaches. *J Mech Behav Biomed Mater* 80:111–118. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2018.01.034>

34. Naghieh S, Karamooz Ravari MR, Badrossamay M, et al (2016) Numerical investigation of the mechanical properties of the additive manufactured bone scaffolds fabricated by FDM: The effect of layer penetration and post-heating. *J Mech Behav Biomed Mater* 59:241–250. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2016.01.031>
35. Miller JS, Stevens KR, Yang MT, et al (2012) Rapid casting of patterned vascular networks for perfusable engineered three-dimensional tissues. *Nat Mater* 11:768–774. <https://doi.org/10.1038/nmat3357>
36. Guillemot F, Souquet A, Catros S, Guillotin B (2010) Laser-assisted cell printing: Principle, physical parameters versus cell fate and perspectives in tissue engineering. *Nanomedicine* 5:507–515. <https://doi.org/10.2217/nnm.10.14>
37. Ozbolat IT (2015) Bioprinting scale-up tissue and organ constructs for transplantation. *Trends Biotechnol* 33:395–400. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.04.005>
38. Datta P, Ayan B, Ozbolat IT (2017) Bioprinting for vascular and vascularized tissue biofabrication. *Acta Biomater*. 51
39. Bourget JM, K  rour  dan O, Medina M, et al (2016) Patterning of Endothelial Cells and Mesenchymal Stem Cells by Laser-Assisted Bioprinting to Study Cell Migration. *Biomed Res Int* 2016:. <https://doi.org/10.1155/2016/3569843>
40. Gauvin R, Chen YC, Lee JW, et al (2012) Microfabrication of complex porous tissue engineering scaffolds using 3D projection stereolithography. *Biomaterials* 33:3824–3834. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.01.048>
41. Hsieh YK, Chen SC, Huang WL, et al (2017) Direct micromachining of microfluidic channels on biodegradable materials using laser ablation. *Polymers (Basel)* 9:. <https://doi.org/10.3390/polym9070242>
42. He J, Mao M, Liu Y, et al (2013) Fabrication of nature-inspired microfluidic network for perfusable tissue constructs. *Adv Healthc Mater* 2:1108–1113. <https://doi.org/10.1002/adhm.201200404>
43. Weston DF, Smekal T, Rhine DB, Blackwell J (2001) Fabrication of microfluidic devices in silicon and plastic using plasma etching. *J Vac Sci Technol B Microelectron Nanom Struct* 19:2846–2851. <https://doi.org/10.1116/1.1421571>
44. Therriault D, White SR, Lewis JA (2003) Chaotic mixing in three-dimensional microvascular networks fabricated by direct-write assembly. *Nat Mater* 2:265–271. <https://doi.org/10.1038/nmat863>
45. Takayama S, Ostuni E, LeDuc P, et al (2001) Subcellular positioning of small molecules. *Nature* 411:1016. <https://doi.org/10.1038/35082637>
46. Tardy Y, Resnick N, Nagel T, et al (1997) Shear stress gradients remodel endothelial monolayers in vitro via a cell proliferation-migration-loss cycle. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17:3102–3106. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.17.11.3102>
47. Tsao CW (2016) Polymer microfluidics: Simple, low-cost fabrication process bridging academic lab research to commercialized production. *Micromachines* 7:. <https://doi.org/10.3390/mi7120225>
48. Baker BM, Trappmann B, Stapleton SC, et al (2013) Microfluidics embedded within extracellular matrix to define vascular architectures and pattern diffusive gradients. *Lab Chip* 13:3246–3252. <https://doi.org/10.1039/c3lc50493j>

49. Okano T, Yamada N, Okuhara M, et al (1995) Mechanism of cell detachment from temperature-modulated, hydrophilic-hydrophobic polymer surfaces1. *Biomater Silver Jubil Compend* 16:109–115. <https://doi.org/10.1016/B978-008045154-1.50015-0>
50. L'Heureux N (2020) Des textiles humains pour réparer les vaisseaux sanguins. In: Doss. Press. l'INSERM. <https://presse.inserm.fr/des-textiles-humains-pour-reparer-les-vaisseaux-sanguins/38165/>
51. Onoe H, Okitsu T, Itou A, et al (2013) Metre-long cell-laden microfibres exhibit tissue morphologies and functions. *Nat Mater*. <https://doi.org/10.1038/nmat3606>
52. Vergnolle N (2019) Organoïdes : Quelle place dans la recherche de demain ? In: Inser. le magazine n°43. <https://www.inserm.fr/actualites-et-evenements/actualites/organoïdes-quelle-place-dans-recherche-demain>
53. Takasato M, Er PX, Chiu HS, et al (2015) Kidney organoids from human iPS cells contain multiple lineages and model human nephrogenesis. *Nature* 526:564–568. <https://doi.org/10.1038/nature15695>
54. Xinari C, Benedetti V, Rizzo P, et al (2012) In Vivo Maturation of Functional Renal Organoids Formed from Embryonic Cell Suspensions. *J Am Soc Nephrol* 23:1857–1868. <https://doi.org/10.1681/ASN.2012050505>
55. Hale LJ, Howden SE, Phipson B, et al (2018) 3D organoid-derived human glomeruli for personalised podocyte disease modelling and drug screening. *Nat Commun* 9:. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07594-z>
56. Phipson B, Er PX, Combes AN, et al (2019) HHS Public Access. 16:79–87. <https://doi.org/10.1038/s41592-018-0253-2.Evaluation>
57. King SM, Higgins JW, Nino CR, et al (2017) 3D proximal tubule tissues recapitulate key aspects of renal physiology to enable nephrotoxicity testing. *Front Physiol* 8:1–18. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00123>
58. Homan KA, Kolesky DB, Skylar-Scott MA, et al (2016) Bioprinting of 3D Convulated Renal Proximal Tubules on Perfusable Chips. *Sci Rep* 6:1–13. <https://doi.org/10.1038/srep34845>
59. Zhang K, Fu Q, Yoo J, et al (2017) 3D bioprinting of urethra with PCL/PLCL blend and dual autologous cells in fibrin hydrogel: An in vitro evaluation of biomimetic mechanical property and cell growth environment. *Acta Biomater* 50:154–164. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2016.12.008>
60. Musah S, Mammoto A, Ferrante TC, et al (2017) Mature induced-pluripotent-stem-cell-derived human podocytes reconstitute kidney glomerular-capillary-wall function on a chip. *Nat Biomed Eng* 1:. <https://doi.org/10.1038/s41551-017-0069>
61. Zhou M, Zhang X, Wen X, et al (2016) Development of a Functional Glomerulus at the Organ Level on a Chip to Mimic Hypertensive Nephropathy. *Sci Rep* 6:1–13. <https://doi.org/10.1038/srep31771>
62. Perez-Castillejos R (2010) Replication of the 3D architecture of tissues. *Mater Today* 13:32–41. [https://doi.org/10.1016/S1369-7021\(10\)70015-8](https://doi.org/10.1016/S1369-7021(10)70015-8)
63. Ross EA, Williams MJ, Hamazaki T, et al (2009) Embryonic Stem Cells Proliferate and Differentiate when Seeded into Kidney Scaffolds. *J Am Soc Nephrol* 20:2338–2347. <https://doi.org/10.1681/ASN.2008111196>
64. Nakayama KH, Batchelder CA, Lee CI, Tarantal AF (2010) Decellularized rhesus monkey kidney

- as a three-dimensional scaffold for renal tissue engineering. *Tissue Eng - Part A* 16:2207–2216. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2009.0602>
65. Fedecostante M, Westphal KGC, Buono MF, et al (2018) Recellularized native kidney scaffolds as a novel tool in nephrotoxicity screening s. *Drug Metab Dispos* 46:1338–1350. <https://doi.org/10.1124/dmd.118.080721>
 66. Kalisky J, Raso J, Rigother C, et al (2016) An easy-to-use and versatile method for building cell-laden microfibres. *Sci Rep*. <https://doi.org/10.1038/srep33328>
 67. Flegeau K, Rubin S, Mucha S, et al (2020) Towards an in vitro model of the glomerular barrier unit with an innovative bioassembly method. *Nephrol Dial Transplant* 35:240–250. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfz094>
 68. Fricain JC, De Olivera H, Devillard R, et al (2017) Impression 3D en médecine régénératrice et ingénierie tissulaire. *Medecine/Sciences* 33:52–59. <https://doi.org/10.1051/medsci/20173301009>
 69. Mordon S (2013) Lasers en médecine. *Tech l'ingénieur Imag médicale, électronique TIC pour la santé base docum*:1–13
 70. National Cancer Institute (2011) Lasers in Cancer Treatment. In: Natl. Cancer Intitute. <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types/surgery/lasers-fact-sheet>
 71. Kang HW, Lee SJ, Ko IK, et al (2016) A 3D bioprinting system to produce human-scale tissue constructs with structural integrity. *Nat Biotechnol* 34:312–319. <https://doi.org/10.1038/nbt.3413>
 72. Ruprecht V, Monzo P, Ravasio A, et al (2017) How cells respond to environmental cues - insights from bio-functionalized substrates. *J Cell Sci* 130:51–61. <https://doi.org/10.1242/jcs.196162>
 73. Lapointe VLS, Fernandes AT, Bell NC, et al (2013) Nanoscale Topography and Chemistry Affect Embryonic Stem Cell Self-Renewal and Early Differentiation. *Adv Healthc Mater* 2:1644–1650. <https://doi.org/10.1002/adhm.201200382>
 74. Mandal BB, Kundu SC (2009) Cell proliferation and migration in silk fibroin 3D scaffolds. *Biomaterials* 30:2956–2965. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.02.006>
 75. Cunha A (2015) Multiscale femtosecond laser surface texturing of titanium and titanium alloys for dental and orthopaedic implants. Université de Bordeaux
 76. Oya K, Aoki S, Shimomura K, et al (2012) Morphological observations of mesenchymal stem cell adhesion to a nanoporous-structured titanium surface patterned using femtosecond laser processing. *Jpn J Appl Phys* 51:. <https://doi.org/10.1143/JJAP.51.125203>
 77. Shinonaga T, Tsukamoto M, Nagai A, et al (2014) Cell spreading on titanium dioxide film formed and modified with aerosol beam and femtosecond laser. *Appl Surf Sci* 288:649–653. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2013.10.090>
 78. Pérez S, Rebollar E, Oujja M, et al (2013) Laser-induced periodic surface structuring of biopolymers. *Appl Phys A Mater Sci Process* 110:683–690. <https://doi.org/10.1007/s00339-012-7186-x>
 79. Lopez J, Laser C, De I, Alphanov C CAHIER TECHNIQUE Le micro-usinage par laser et ses applications. 46–50
 80. Gattass RR, Mazur E (2008) Femtosecond laser micromachining in transparent materials. *Nat*

Photonics 2:219–225. <https://doi.org/10.1038/nphoton.2008.48>

81. Itoh K, Watanabe W, Nolte S, Schaffer CB (2006) Ultrafast processes for bulk modification of transparent materials. *MRS Bull* 31:620–625. <https://doi.org/10.1557/mrs2006.159>
82. Ding L, Jani D, Linhardt J, et al (2009) Optimization of femtosecond laser micromachining in hydrogel polymers ACCUMULATION IN THE PRESENCE OF WATER AND ITS EFFECT ON. 26:1679–1687
83. Touboul D, Salin F, Mortemousque B, et al (2005) Avantages et inconvénients du microkératome laser femtoseconde. *J Fr Ophtalmol* 28:535–546. [https://doi.org/10.1016/S0181-5512\(05\)81094-0](https://doi.org/10.1016/S0181-5512(05)81094-0)
84. Kang W, Adnan A, O'Shaughnessy T, Bagchi A (2018) Cavitation nucleation in gelatin: Experiment and mechanism. *Acta Biomater* 67:295–306. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.11.030>
85. Bhuyan MK, Soleilhac A, Somayaji M, et al (2018) High fidelity visualization of multiscale dynamics of laser-induced bubbles in liquids containing gold nanoparticles. *Sci Rep* 8:1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-27663-z>
86. Centrale É, Université DL, Bernard C (2015) Caractérisation optique et acoustique d' une bulle générée par focalisation laser Résumé : Abstract :
87. Vogel A, Busch S, Parltitz U (1996) Shock wave emission and cavitation bubble generation by picosecond and nanosecond optical breakdown in water. *J Acoust Soc Am* 100:148–165. <https://doi.org/10.1121/1.415878>
88. Oujja M, Pérez S, Fadeeva E, et al (2009) Three dimensional microstructuring of biopolymers by femtosecond laser irradiation. *Appl Phys Lett* 95:. <https://doi.org/10.1063/1.3274127>
89. Gaspard S, Oujja M, Abrusci C, et al (2008) Laser induced foaming and chemical modifications of gelatine films. *J Photochem Photobiol A Chem* 193:187–192. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2007.06.024>
90. Vogel A, Noack J, Nahen K, et al (1999) Energy balance of optical breakdown in water at nanosecond to femtosecond time scales. *Appl Phys B Lasers Opt* 68:271–280. <https://doi.org/10.1007/s003400050617>
91. Heintz KA, Bregenzer ME, Mantle JL, et al (2016) Fabrication of 3D Biomimetic Microfluidic Networks in Hydrogels. *Adv Healthc Mater*. <https://doi.org/10.1002/adhm.201600351>
92. Applegate MB, Coburn J, Partlow BP, et al (2015) Laser-based three-dimensional multiscale micropatterning of biocompatible hydrogels for customized tissue engineering scaffolds. *Proc Natl Acad Sci*. <https://doi.org/10.1073/pnas.1509405112>
93. Wang F, Wang M, She Z, et al (2015) Collagen/chitosan based two-compartment and bi-functional dermal scaffolds for skin regeneration. *Mater Sci Eng C* 52:155–162. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.03.013>
94. Sassi ML, Eriksen H, Risteli L, et al (2000) Immunochemical characterization of assay for carboxyterminal telopeptide of human type I collagen: loss of antigenicity by treatment with cathepsin K. *Bone* 26:367–373. [https://doi.org/10.1016/S8756-3282\(00\)00235-0](https://doi.org/10.1016/S8756-3282(00)00235-0)
95. Kleinman HK, Klebe RJ, Martin GR (1981) Role of collagenous matrices in the adhesion and growth of cells. *J Cell Biol* 88:473–485. <https://doi.org/10.1083/jcb.88.3.473>
96. Junqueira LC, Carneiro J (1996) *Histologie* 4th, Springer:

97. Jokinen J, Dadu E, Nykvist P, et al (2004) Integrin-mediated cell adhesion to type I collagen fibrils. *J Biol Chem* 279:31956–31963. <https://doi.org/10.1074/jbc.M401409200>
98. Lacolley P, Challande P (1997) Interactions cellule/matrice et propriétés élastiques des gros troncs artériels. *médecine/sciences* 799–808
99. Iordan A, Duperray A, Gérard A, et al (2010) Breakdown of cell-collagen networks through collagen remodeling To cite this version : HAL Id : hal-00461130 Cell-collagen networks breakdown by collagen remodelling
100. Scholkmann F, Kleiser S, Metz AJ, et al (2014) A review on continuous wave functional near-infrared spectroscopy and imaging instrumentation and methodology. *Neuroimage* 85:6–27. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2013.05.004>
101. Taroni P, Bassi A, Comelli D, et al (2009) Diffuse optical spectroscopy of breast tissue extended to 1100 nm. *J Biomed Opt* 14:054030. <https://doi.org/10.1117/1.3251051>
102. Smith NI, Fujita K, Nakamura O, Kawata S (2001) Three-dimensional subsurface microprocessing of collagen by ultrashort laser pulses. *Appl Phys Lett*. <https://doi.org/10.1063/1.1347392>
103. Hribar KC, Meggs K, Liu J, et al (2015) Three-dimensional direct cell patterning in collagen hydrogels with near-infrared femtosecond laser. *Sci Rep*. <https://doi.org/10.1038/srep17203>
104. Brandenberg N, Lutolf MP (2016) In Situ Patterning of Microfluidic Networks in 3D Cell-Laden Hydrogels. *Adv Mater*. <https://doi.org/10.1002/adma.201601099>
105. M.S. CJ, Van Kooten TG (2015) An In Vivo Study of Composite Microgels Based on Hyaluronic Acid and Gelatin for the Reconstruction of Surgically Injured Rat Vocal Folds. *JSLHR* 1:164–173. https://doi.org/10.1044/2014_JSLHR-S-12-0292
106. Davidenko N, Schuster CF, Bax D V., et al (2016) Evaluation of cell binding to collagen and gelatin: a study of the effect of 2D and 3D architecture and surface chemistry. *J Mater Sci Mater Med* 27:. <https://doi.org/10.1007/s10856-016-5763-9>
107. Cook JR, Bouchard RR, Emelianov SY (2011) Tissue-mimicking phantoms for photoacoustic and ultrasonic imaging. *Biomed Opt Express* 2:3193. <https://doi.org/10.1364/boe.2.003193>
108. Jessel R, Haertel S, Socaciu C, et al (2002) Kinetics of apoptotic markers in exogeneously induced apoptosis of EL4 cells. *J Cell Mol Med* 6:82–92. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2002.tb00313.x>
109. Zeigler MB, Chiu DT (2009) Laser selection significantly affects cell viability following single-cell nanosurgery. *Photochem Photobiol*. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2009.00581.x>
110. Saleem MA, O'Hare MJ, Reiser J, et al (2002) A Conditionally Immortalized Human Podocyte Cell Line Demonstrating Nephron and Podocin Expression. *J Am Soc Nephrol* 13:630–638
111. Pierre P (2019) Mémoire de master 2 Fabrication d'un réseau glomérulaire microvascularisé : modèle d'étude de la
112. Bur P (2017) Fabrication d'un réseau glomérulaire micro - vascularisé : modèle d'étude de la physiopathologie glomérulaire
113. Préterre J (2018) Fabrication d'un réseau glomérulaire microvascularisé : modèle d'étude de la physiopathologie glomérulaire .
114. Li YH, Yue JC, Cai GP (1997) Fluorescence characterization of type I collagen from normal and silicotic rats and its quenching dynamics induced by hypocrellin B. *Biopolym - Nucleic Acid Sci*

Sect 42:219–226. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0282\(199708\)42:2<219::AID-BIP10>3.0.CO;2-G](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0282(199708)42:2<219::AID-BIP10>3.0.CO;2-G)

115. Rossetti F., Depieri LV, Bentley MV (2013) Confocal Laser Scanning Microscopy as a Tool for the Investigation of Skin Drug Delivery Systems and Diagnosis of Skin Disorders. In: Lagali N (ed) Confocal Laser Microscopy - Principles and Applications in Medicine, Biology, and the Food Sciences
116. Gamaly EG, Rode A V. (2013) Physics of ultra-short laser interaction with matter: From phonon excitation to ultimate transformations. *Prog Quantum Electron* 37:215–323. <https://doi.org/10.1016/j.pquantelec.2013.05.001>
117. Jacques SL (2013) Erratum: Optical properties of biological tissues: A review (*Physics in Medicine and Biology* (2013) 58). *Phys Med Biol* 58:5007–5008. <https://doi.org/10.1088/0031-9155/58/14/5007>
118. Sliney DH, Wolbarsht M (1980) Safety with Lasers and Other Optical Sources : A Comprehensive Handbook, Plenum Pre
119. Débarre D, Pena AM, Supatto W, et al (2006) Second- and third-harmonic generation microscopies for the structural imaging of intact tissues. *Medicine/Sciences* 22:845–850. <https://doi.org/10.1051/medsci/20062210845>
120. Pons T, Mertz J (2005) Imager dans la profondeur des tissus: les microscopies biphotoniques. *Images la Phys* 159–165
121. Schanne-Klein M-C (2017) L'imagerie multiphoton des peaux naturelles et synthétiques - Un nouvel outil pour l' évaluation des produits cosmétiques. *Photoniques*
122. Verit I, RIGOTIER C, GEMINI L, et al (2019) Biofabrication of a vascular capillary by ultra-short laser pulses
123. Vérit I, Gemini L, Fricain JC, et al (2020) Intra-volume processing of gelatine hydrogel by femtosecond laser-induced cavitation. *Lasers Med Sci*. <https://doi.org/10.1007/s10103-020-03081-4>
124. Pradhan DS, Keller KA, Sperduto, Slater JH (2017) Fundamentals of Laser-Based Hydrogel Degradation and Applications in Cell and Tissue Engineering. *Adv Healthc Mater*. <https://doi.org/10.1002/adhm.201700681>
125. Rebière A (2016) Ultrashort Laser Bioengineering : Micropatterning of Cellularized
126. Carlsson J, Gabel D, Larsson E, et al (1979) Protein-coated agarose surfaces for attachment of cells. *Soc Vitro Biol* 15:844–850. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/BF02618038>
127. Hospices Civils de Lyon (2017) Syndrome néphrotique. <https://www.chu-lyon.fr/fr/espace-sante/syndrome-nephrotique>
128. Larousse Définitions : physiopathologie. <https://www.larousse.fr/dictionnaires/francais/physiopathologie/60625>