



HAL
open science

Développement, validation et caractérisation d'un modèle ex vivo de peau humaine perfusé: FlowSkin

Emma Raude

► **To cite this version:**

Emma Raude. Développement, validation et caractérisation d'un modèle ex vivo de peau humaine perfusé: FlowSkin. Médecine humaine et pathologie. INSA de Toulouse, 2020. Français. NNT: 2020ISAT0015 . tel-03185460

HAL Id: tel-03185460

<https://theses.hal.science/tel-03185460>

Submitted on 30 Mar 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

**En vue de l'obtention du
DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE
Délivré par l'Institut National des Sciences Appliquées de
Toulouse**

**Présentée et soutenue par
Emma RAUDE**

Le 13 octobre 2020

**Développement, validation et caractérisation d'un modèle ex vivo
de peau humaine perfusé : FlowSkin.**

Ecole doctorale : **SDM - SCIENCES DE LA MATIERE - Toulouse**

Spécialité : **Chimie-Biologie-Santé**

Unité de recherche :

LAAS - Laboratoire d'Analyse et d'Architecture des Systèmes

Thèse dirigée par
Laurent MALAQUIN

Jury

Mme Stéphanie DESCROIX, Rapporteur
Mme Bérengère FROMY, Rapporteur
Mme Nathalie PICOLLET-D'HAHAN, Examinatrice
M. Guy SERRE, Examineur
M. Laurent MALAQUIN, Directeur de thèse
M. Christophe VIEU, Président

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier l'ensemble des personnes ayant été impliquées dans cette thèse, et sans qui ce projet n'aurait pu aboutir.

Je tiens tout d'abord à remercier Mesdames Stéphanie Descroix et Bérengère Fromy d'avoir accepté d'évaluer mon projet de thèse et de discuter de ces travaux. Je remercie également Mesdames Nathalie Picollet D'Hahan et Marie Tauber, et Monsieur Guy Serre d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse, ainsi que Monsieur Christophe Vieu pour la présidence de ce jury.

Mes remerciements s'adressent ensuite à mes directeurs de thèse Laurent Malaquin et Emeline Pagès. Un grand merci à tous les deux pour votre bienveillance, votre soutien et votre implication dans ce projet durant ces quatre années. J'ai été ravie de pouvoir travailler avec vous et j'espère que cette collaboration durera encore longtemps !
Merci également à Pascal Descargues de m'avoir fait confiance et de m'avoir permis d'intégrer l'entreprise Genoskin en tant que stagiaire, puis en tant que doctorante et maintenant en tant que Chef de projet.

Je remercie chaleureusement l'ensemble de l'entreprise Genoskin, aussi bien l'équipe française que l'équipe américaine. Vous êtes maintenant bien trop nombreux pour que je puisse vous citer un par un, mais sachez que vous avez tous contribué d'une façon ou d'une autre à la réussite de ce projet, que ce soit par votre aide et vos conseils techniques, votre soutien, vos encouragements, mais aussi et surtout par votre bonne humeur et vos sourires. Je suis très heureuse de pouvoir continuer à travailler avec vous tous.
Un merci tout particulier à Claire et Anthony, pour leur amitié fidèle, mais surtout pour les soirées tapas romantiques ... Cette thèse n'aurait pas été la même sans vous !

Mes remerciements se tournent ensuite vers l'équipe ELiA du LAAS-CNRS. Je remercie chacun d'entre vous pour tous les bons moments partagés, et toutes ces discussions scientifiques très enrichissantes. Je remercie également l'équipe I2C et principalement Sandrine Assié-Souleille, Charline Blatché, Julie Foncy et Xavier Dollat pour leur aide technique sur ce projet.

Je remercie Paul Duru, Pauline Lefebvre, Pauline Assemat, Sylvie Lorthois et Edith Larue pour votre support technique et vos précieux conseils lors de l'utilisation du tomographe à rayons X.

Enfin, je voudrais remercier ma famille, mes amis et Lucas, de m'avoir porté et supporté durant toutes ces années, et d'avoir cru en moi depuis le début.

AVANT-PROPOS

Les modèles organotypiques tels que les explants de peau humaine sont les modèles les plus complexes et parmi les plus représentatifs de la peau *in vivo* existants à ce jour pour tester l'efficacité ou l'innocuité de molécules d'intérêts thérapeutiques au stade des études pré-cliniques. Toutefois, l'absence de circulation sanguine et lymphatique dans ces modèles reste une limite importante dans l'homéostasie du tissu, notamment pour prédire les réponses de la peau à un traitement. La microfluidique offre un fort potentiel pour contrôler la convection et la diffusion permettant l'échange de composés dans ces modèles de peau.

C'est dans ce contexte que l'idée du développement d'un modèle *ex vivo* de peau humaine perfusé a vu le jour. Le projet FlowSkin a débuté il y a quatre ans dans l'entreprise Genoskin (Toulouse), avec le stage de fin d'étude d'un étudiant de l'Université de Technologie de Compiègne, spécialisé en biomécanique et biomatériaux. J'ai eu l'occasion de collaborer avec Arthur Gobin durant mon stage de 4^{ème} année d'école d'ingénieur à l'Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse. Ce projet s'est poursuivi par mon stage de fin d'études en collaboration entre le Laboratoire d'Analyse et d'Architecture des Systèmes (LAAS-CNRS, Toulouse) et Genoskin, puis par une thèse de trois ans dans le cadre d'une convention CIFRE (Convention Industrielle de Formation par la Recherche). Cette thèse a été co-encadrée par Laurent Malaquin (LAAS-CNRS) et Emeline Pagès (Genoskin). Ce projet de recherche pluridisciplinaire a fait appel aux connaissances acquises durant ma formation initiale d'ingénieure en biologie, mais aussi à des compétences nouvelles issues de domaines tels que la physique ou la microfluidique. En parallèle, j'ai eu l'occasion d'assumer certaines fonctions pour l'entreprise, telles que la gestion de projet pour des études clients.

Différentes personnes ont permis l'avancement de ce projet. Tout d'abord, deux stagiaires ont été impliquées dans le développement du modèle FlowSkin. Alexiane Larroche en 2019, a notamment travaillé sur la caractérisation de la diffusion dans le modèle perfusé et le développement d'un modèle numérique de la diffusion dans les explants. Marion Meseguer, actuellement en stage dans l'entreprise, travaille sur l'optimisation des paramètres de production et de perfusion du modèle, afin de résoudre certains problèmes de reproductibilité rencontrés dans les expériences. Cette thèse a également été l'occasion de rencontrer des spécialistes afin d'échanger au sujet de ce projet de recherche, comme Sylvie Lorthois, bio-mécanicienne à l'Institut de Mécanique des Fluides de Toulouse (IMFT), qui travaille notamment sur la circulation cérébrale, et Nicolas Meyer, onco-dermatologue à l'Institut Universitaire du Cancer de Toulouse (IUCT).

Ce projet de thèse a mené au dépôt d'un brevet concernant un système microfluidique permettant de contrôler la perfusion, la diffusion et la collecte de molécules sur de longues périodes dans un modèle de peau *ex vivo*.

La fin de cette thèse a été marquée par la pandémie de COVID-19. Le confinement et le Plan Blanc déployés dans l'ensemble du territoire français ont ralenti considérablement l'accès aux échantillons de peau nécessaires aux expériences, nécessitant la modification des dernières manipulations prévues dans le cadre de la thèse.

RÉSUMÉ

Développement, validation et caractérisation d'un modèle *ex vivo* de peau humaine perfusé : FlowSkin.

Les modèles organotypiques tels que les explants de peau humaine sont les modèles les plus complexes et parmi les plus représentatifs de la peau *in vivo* existants à ce jour pour tester l'efficacité ou l'innocuité de molécules d'intérêts thérapeutiques au stade des études pré-cliniques. Cependant, l'absence de circulation sanguine et lymphatique dans ces modèles reste une limite importante dans l'homéostasie du tissu, notamment pour prédire les réponses de la peau à un traitement. De plus, les échanges en nutriments et en oxygène n'étant possibles que par diffusion, la durée de vie de ces modèles reste limitée. Différentes stratégies ont été mises en place afin de contrôler les mécanismes de transports moléculaires au sein de tissus biologiques. La microfluidique offre un fort potentiel pour contrôler la convection et la diffusion permettant l'échange de composés dans ces modèles de peau.

L'objectif de ce projet est de développer, caractériser et valider un modèle de peau humaine *ex vivo* perfusé. Le but de cette perfusion intra-tissulaire est de favoriser les échanges de nutriments, d'oxygène ou de médicaments, mais également d'améliorer l'élimination des déchets métaboliques.

Le premier objectif de mes travaux a consisté à mettre en place un flux intra-tissulaire dans un explant de peau humaine, et à développer un procédé permettant de maintenir l'explant perfusé en culture pendant plusieurs jours. Pour cela, un dispositif poreux a été implanté dans le derme du modèle *ex vivo* de peau humaine NativeSkin®, développé par la société Genoskin, puis relié à un système microfluidique permettant l'infusion de composés au sein du tissu.

Le deuxième objectif a consisté à développer des méthodes d'analyse de la diffusion de composés dans des explants de peau. Quatre méthodes ont été développées : l'évaluation macroscopique et qualitative de la diffusion à l'aide d'un colorant, l'étude de la diffusion en temps réel par radiographie à rayons X, l'étude de la diffusion en trois dimensions par tomographie à rayons X, et enfin l'analyse de la diffusion de dextrans fluorescents de différents poids moléculaires sur coupes histologiques. Un modèle numérique permettant de simuler la diffusion dans le modèle de peau a également été développé sur le logiciel COMSOL, permettant de prédire le profil de diffusion d'un composé.

Le troisième et dernier objectif a consisté à déterminer les paramètres de perfusion permettant une bonne diffusion des composés dans l'explant de peau, sans toutefois endommager le tissu. Une première série d'expériences (8 donneurs) a été réalisée sur des modèles perfusés à flux constant (2,5 $\mu\text{L}/\text{min}$) avec du milieu de culture, pendant 10 jours. Les résultats ont montré qu'à l'issue de la culture, les modèles de peau ne présentent pas d'altération de la viabilité cellulaire ni de l'intégrité du tissu, avec un maintien de la prolifération et du métabolisme cellulaire. Cependant, la caractérisation de la diffusion dans le modèle a démontré un manque de reproductibilité dans les expériences, avec d'importantes variabilités *inter* et *intra*-donneurs. De plus, la perfusion de dextrans de différents poids moléculaires a démontré que la diffusion de composés de hauts poids moléculaires était limitée. Afin de pallier ces limites, nous avons proposé une nouvelle méthode de perfusion basée sur une modulation de la pression au sein du dispositif. L'application d'une légère surpression au sein du dispositif poreux permet d'améliorer la reproductibilité et l'efficacité des échanges moléculaires au sein de l'explant.

Les résultats obtenus positionnent le modèle FlowSkin ainsi développé comme un nouvel outil pertinent pour évaluer l'efficacité ou la toxicité de molécules administrées par voie intraveineuse, directement sur de la peau humaine. De plus, la perfusion de transporteurs d'oxygène via ce système pourrait permettre de prolonger la durée de vie et donc d'améliorer encore la pertinence du modèle de peau *ex vivo*.

Mots-clés :

Peau humaine – Modèle *ex vivo* - Microfluidique - Vascularisation – Perfusion - Transport moléculaire

Development, validation and characterization of a perfused *ex vivo* human skin model: FlowSkin.

Organotypic models as human skin explants are the most complex and among the most representative of *in vivo* skin existing today to test the efficacy or the safety of molecules of therapeutic interest during preclinical studies. However, the loss of vascularization and lymphatic system in these models remains a major limitation in tissue homeostasis that impedes the prediction of skin responses to a treatment. In addition, exchanges of nutrients and oxygen being limited to diffusion, models lifetime is limited. Different strategies have been implemented to study and improve mass transport mechanism in such models. Microfluidics offers a great potential to control diffusion and convection mechanisms that permit molecular exchanges in skin models.

The objective of this project is to develop, characterize and validate an *ex vivo* perfused human skin model. The purpose of this intra tissue infusion is to promote the exchanges of nutrients, oxygen or drugs, but also to improve metabolic waste elimination.

The first objective of my work consisted in implementing an intra tissue flow in a human skin explant, and in setting up a process to maintain the perfused model in culture for several days. To this end, a porous device was implanted in the dermis of the *ex vivo* human skin model NativeSkin®, developed by the company Genoskin. The implantable device is then connected to a microfluidic system allowing the infusion of compounds within the tissue.

The second objective was to develop analysis methods of the diffusion of compounds in skin explants. Four methods have been developed: macroscopic and qualitative evaluation of the diffusion using a dye, the study of the diffusion in real time by X-ray radiography, the study of the diffusion in three dimensions by X-ray tomography, and finally the analysis of the diffusion of fluorescent dextrans of different molecular weights on histological sections. A numerical model allowing to simulate the diffusion in the skin model has also been developed using COMSOL software, allowing to predict the diffusion profile of a compound.

The third and last objective of my work was to determine perfusion parameters allowing efficient molecular exchanges of compounds in the skin explant, but without damaging the tissue. A first series of experiments (8 donors) was carried out on models perfused with a constant flow-rate (2.5 $\mu\text{L}/\text{min}$) with culture medium, for 10 days. The results showed that at the end of the culture, skin models did not show any alteration in cell viability or tissue integrity, with maintenance of cell proliferation and metabolism. However, diffusion characterization in the model demonstrated a lack of reproducibility in the experiments, with significant *inter* and *intra* donor variability. In addition, the infusion of different molecular weights dextrans has demonstrated that the mass transport of high molecular weight compounds was limited through the implantable device. We demonstrated that the control of the fluid pressure is critical and that imposing a pulsatile injection with slight overpressures improves the efficiency and reproducibility of the molecular species delivery and collection in the explant.

These results have shown the potential of the developed FlowSkin model as a new tool to study the efficacy or toxicity of intravenously administered drugs directly onto human skin. In addition, the combination of FlowSkin with perfusion of oxygen carriers offers unique opportunities to extend the lifetime and further improve the relevance of such *ex vivo* skin model.

Keywords :

Human skin – *Ex vivo* model – Microfluidics – Vascularization – Perfusion – Mass transport

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	1
AVANT-PROPOS	3
RÉSUMÉ	5
TABLE DES MATIÈRES	9
LISTE DES FIGURES.....	15
GLOSSAIRE	25
INTRODUCTION	29
Partie 1. Présentation générale de la peau humaine, de sa structure et de ses modèles d'étude <i>in vitro</i>	31
1. Les rôles de la peau	31
2. La structure générale de la peau	31
3. Les modèles d'études <i>in vitro</i> de la peau.....	39
Partie 2. La microcirculation cutanée	49
1. Les rôles de la microcirculation.....	49
2. La structure générale de la microcirculation cutanée.....	55
3. Pression et vitesse d'écoulement	59
4. Les échanges au niveau des capillaires	61
Partie 3. Les méthodes existantes pour favoriser les échanges au sein d'un tissu <i>in vitro</i> , <i>in vivo</i> , <i>ex vivo</i> et en clinique	65
1. Les techniques utilisées afin de favoriser les échanges dans les tissus.....	65
2. Les techniques de perfusion utilisées en clinique	77
Partie 4. Les techniques d'étude de la distribution tissulaire d'un composé.....	93
1. Les techniques basées sur l'utilisation de radioisotopes	93
2. La tomographie à rayons X.....	101
3. Microscopie de fluorescence	103
4. La spectrométrie de masse par désorption/ionisation assistée par laser (MALDI-MSI)	107
OBJECTIFS DE LA THÈSE	113
RÉSULTATS.....	115

Partie 1 : Mise en place d'un flux intra-tissulaire dans un modèle de peau humaine <i>ex vivo</i>	117
1. Présentation des différents dispositifs poreux testés	117
2. Techniques d'implantation du dispositif	121
3. Evaluation de l'impact de l'implantation prolongée du cathéter non perfusé sur la physiologie de la peau	123
4. Adaptation des consommables de culture cellulaire pour la culture d'un modèle de peau <i>ex vivo</i> perfusé.....	131
5. Présentation des différentes pompes testées	133
6. Le modèle FlowSkin	137
Partie 2. Développement de méthodes d'analyse de la diffusion de composés dans des explants de peau humaine	139
1. Evaluation macroscopique et qualitative de la diffusion d'un colorant	139
2. Evaluation de la diffusion en temps réel par radiographie à rayons X	145
3. Evaluation de la diffusion en 3 dimensions par tomographie à rayons X.....	147
4. Evaluation de la diffusion de dextrans fluorescents de différents poids moléculaires.....	149
5. Simulation numérique de la diffusion d'un composé dans un modèle de peau humaine <i>ex vivo</i>	153
Partie 3. Evaluation des effets de la perfusion sur le modèle FlowSkin	163
1. Paramètres de perfusion	163
2. Evaluation des effets de la perfusion sur le modèle FlowSkin	163
3. Evaluation de l'impact de la modulation de la pression à l'intérieur du cathéter sur l'efficacité des échanges entre le perfusé et la peau	191
DISCUSSION.....	197
Partie 1. Développement d'un modèle <i>ex vivo</i> de peau humaine perfusé.....	199
1. Développement et choix du dispositif implantable	199
2. Implantation du dispositif microporeux dans la peau	202
3. Production du modèle perfusé	204

Partie 2. Amélioration des échanges avec le tissu grâce au système de perfusion	207
1. Détermination des coefficients de diffusion de différents composés dans la peau	207
2. Développement d'un modèle numérique de la diffusion d'un composé dans un modèle de peau	209
3. Perfusion d'un modèle de peau en libre circulation	209
4. Perspectives d'amélioration des paramètres de perfusion pour favoriser les échanges de manière significative et améliorer la reproductibilité des expériences	211
Partie 3. Perspectives d'applications du modèle FlowSkin	215
1. Prolongation de la durée de vie des modèles de peau <i>ex vivo</i>	215
2. Amélioration du transport de molécules dans le tissu	216
3. Evaluation de la toxicité, l'innocuité ou l'efficacité de médicaments administrés par voie systémique	218
4. Evaluation de la biodisponibilité, la distribution ou la pénétration cutanée de médicaments	218
5. Evaluation des réponses inflammatoires	219
CONCLUSION	221
MATÉRIEL & MÉTHODES	225
1. Production des modèles NativeSkin® et FlowSkin	227
2. Culture des modèles NativeSkin® et FlowSkin	230
3. Analyses histologiques	230
4. Analyse de la diffusion	234
5. Simulation numérique de la diffusion	239
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	243

LISTE DES FIGURES

Figure 1. La structure de la peau humaine.....	30
Figure 2. Les différentes couches de l'épiderme.	30
Figure 3. Coloration Hématoxyline et Eosine d'une coupe de peau humaine.....	34
Figure 4. La structure du follicule pileux..	36
Figure 5. Processus de production d'un modèle de peau reconstruite.	40
Figure 6. Le modèle de peau humaine <i>ex vivo</i> NativeSkin®.	42
Figure 7. Caractérisation du modèle NativeSkin®.....	44
Figure 8. Le réseau vasculaire cutané.	48
Figure 9. Les échanges entre le système vasculaire, le tissu et le système lymphatique.	48
Figure 10. Les anses capillaires.....	50
Figure 11. Les différentes voies d'administration systémiques d'un médicament.....	52
Figure 12. La structure des vaisseaux.	54
Figure 13. Les différents types de capillaires..	56
Figure 14. Les mécanismes impliqués dans les échanges au niveau des capillaires.....	60
Figure 15. Principe de la culture statique vs la culture dynamique.....	64
Figure 16. Exemple d'application de la culture dynamique à un modèle de peau reconstruite.	66
Figure 17. Principe de la microdialyse.	68
Figure 18. Principe de la microperfusion en libre circulation..	70
Figure 19. Exemple de pré-vascularisation d'un modèle de peau reconstruite grâce à la création de microcanaux par soustraction.....	74
Figure 20. Les différents types de pompes utilisés pour l'administration de composés par perfusion.	80
Figure 21. La circulation extracorporelle.	88
Figure 23. Micro-autoradiographie d'une coupe de peau de rat.	96
Figure 24. Tomographie aux rayons X d'une coupe de biopsie de peau de porc..	102
Figure 25. La technique de Fluorescent Recovery After Photobleaching (FRAP).	106
Figure 26. Spectrométrie de masse MALDI sur une coupe de peau d'oreille de cochon.	108
Figure 27. Présentation du modèle FlowSkin.....	116
Figure 28. Présentation de la sonde de microdialyse.....	116
Figure 29. Présentation du premier type de cathéter microporeux.....	118
Figure 30. Présentation du deuxième type de cathéter microporeux.	118
Figure 31. Présentation de la première technique d'implantation.....	120
Figure 32. Présentation de la deuxième technique d'implantation.	122

Figure 33. Evaluation de l'impact de l'implantation prolongée d'un cathéter non perfusé sur l'intégrité de la peau.	124
Figure 34. Evaluation de l'impact de l'implantation prolongée d'un cathéter non perfusé sur la prolifération cellulaire.	126
Figure 35. Quantification de l'impact de l'implantation prolongée d'un cathéter non perfusé sur la prolifération cellulaire.	127
Figure 36. Evaluation de l'impact de l'implantation prolongée d'un cathéter non perfusé sur la mort cellulaire.	128
Figure 37. Coupe d'un modèle de peau dans lequel un cathéter a été implanté.	129
Figure 38. Présentation des supports de culture fabriquées pour la perfusion des modèles de peau.	130
Figure 39. Evaluation de l'impact de la culture dans des supports en PDMS sur l'intégrité et la viabilité des modèles de peau.	132
Figure 40. Adaptation des inserts de culture pour la perfusion des modèles de peau..	132
Figure 41. Présentation du système FlowSkin.	136
Figure 42. Détermination du coefficient de diffusion d'un colorant dans la peau.	140
Figure 43. Détermination du coefficient de diffusion d'un colorant dans la matrice.	142
Figure 44. Caractérisation des échanges entre le milieu et la biopsie et entre la matrice et la biopsie dans le modèle NativeSkin®.	144
Figure 45. Présentation du système d'acquisition en radiographie et tomographie à rayons X (IMFT, Toulouse).	146
Figure 46. Diffusion de dextrans fluorescents de 10 et 70 kDa dans des biopsies de peau.	148
Figure 47. Détermination du coefficient de diffusion des dextrans dans la peau.	150
Figure 48. Diffusion de dextrans fluorescents de 10 et 70 kDa dans le modèle NativeSkin®.	152
Figure 49. Simulation de la diffusion d'un colorant dans une biopsie en flottaison.	154
Figure 50. Simulation de la diffusion dans une biopsie en flottaison sur du colorant vs dans une biopsie approvisionnée en colorant uniquement par les côtés.	156
Figure 51. Simulation de la diffusion d'un composé présent dans la matrice du modèle NativeSkin®.	158
Figure 52. Simulation de la diffusion d'un composé présent dans le milieu de culture du modèle NativeSkin®.	158
Figure 53. Simulation de la diffusion d'un composé présent dans le milieu de culture et dans la matrice du modèle NativeSkin®.	160
Figure 54. Comparaison de la diffusion d'un composé pour différentes voies d'administration après 24 heures de culture.	160

Figure 55. Evaluation macroscopique de la diffusion d'un colorant dans le modèle FlowSkin durant le premier jour de culture.....	162
Figure 56. Evolution de la diffusion dans le modèle FlowSkin sur 10 jours de culture..	164
Figure 57. Evaluation en temps réel de la diffusion d'un agent de contraste (KI) de faible poids moléculaire dans le modèle FlowSkin.....	166
Figure 58. Evaluation en trois dimensions de la diffusion d'un agent de contraste de faible poids moléculaire dans le modèle FlowSkin.....	168
Figure 59. Evaluation de la diffusion d'un dextran de 10 kDa dans des modèles de peau après 24 heures de culture.	170
Figure 60. Evaluation de la diffusion d'un dextran de 70 kDa dans des modèles de peau après 24 heures de culture.	172
Figure 61. Simulation de la diffusion d'un composé perfusé via le cathéter microporeux dans le modèle FlowSkin.	174
Figure 62. Comparaison entre la simulation de la diffusion dans le modèle FlowSkin et les résultats expérimentaux.	176
Figure 63. Comparaison entre les simulations des modèles NativeSkin® et FlowSkin.	178
Figure 64. Evaluation de l'impact de la perfusion sur la viabilité des modèles de peau..	180
Figure 65. Evaluation de l'impact de la perfusion sur l'intégrité des modèles de peau.	182
Figure 66. Evaluation de l'impact de la perfusion sur la prolifération cellulaire dans les modèles de peau.	184
Figure 67. Evaluation de l'impact de la perfusion sur la mort cellulaire dans les modèles de peau.....	186
Figure 68. Evaluation de l'impact de la perfusion sur le métabolisme cellulaire des modèles de peau.....	188
Figure 69. Induction d'une surpression dans le dispositif microporeux.....	192
Figure 70. Evaluation de l'impact de l'induction d'une surpression dans le cathéter sur les échanges entre le perfusé et le tissu.....	194
Figure 71. Progression du front de concentration c^* en fonction du temps.	236

LISTE DES ABRÉVIATIONS

2D	Deux dimensions
3D	Trois dimensions
ADME	Absorption, Distribution, Métabolisme et Excrétion
BSA	Albumine de sérum bovin (Bovine Serum Albumine)
CEC	Circulation Extra-Corporelle
CIFRE	Convention Industrielle de Formation par la Recherche
CRO	Société de recherche contractuelle (Contract Research Organization)
DAPI	4',6-DiAmidino-2-PhénylIndole
ELISA	Dosage d'immunoabsorption par enzyme liée (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)
FRAP	Redistribution de fluorescence après photoblanchiment (Fluorescent Recovery After Photobleaching)
HBSS	Hanks Balanced Salt Solution
HbOCs	Transporteurs d'oxygène basés sur l'hémoglobine (Hemoglobin-based Oxygen Carriers)
HIV	Virus de l'immunodéficience humaine (Human Immunodeficiency Virus)
HUVEC	Cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine (Human umbilical vein endothelial cell)
IFN-γ	Interféron Gamma
IL-1β	InterLeukine-1 Bêta
IL-6	InterLeukine-6
IL-8	InterLeukine-8
IL-17A	InterLeukine-17A
IL-17AF	InterLeukine-17AF
IL-17F	InterLeukine-17F
IL-22	InterLeukine-22
IL-23	InterLeukine-23
IL-33	InterLeukine-33
LAAS	Laboratoire d'Analyse et d'Architecture des Systèmes

MALDI-MSI	Spectrométrie de masse par ionisation par désorption laser assistée par matrice (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Mass Spectrometry Imaging)
MARG	Micro-AutoRadioGraphie
MEB	Microscope Electronique à Balayage
MEMS	Systèmes microélectromécaniques (MicroElectroMechanical Systems)
NHDF	Fibroblastes humains dermiques normaux (Normal Human Dermal Fibroblasts)
NHEK	Kératinocytes humains épidermiques normaux (Normal Human Epidermal Keratinocytes)
OCT	Optimal Cutting Temperature compound
OG	Olumacostat Glasaretil
PBS	Phosphate Buffered Saline
PDMS	PolyDiMéthylSiloxane
PES	PolyEtherSulfone
PET	Tomographie par émission de positons (Positron Emission Tomography)
PFC	PerFluoroCarbone
PFN	Pression de Filtration Nette
PSM	Poste de Sécurité Microbiologique
QWBA	Autoradiographie quantitative du corps entier (Quantitative Whole Body Autoradiography)
ROS	Dérivé réactif de l'oxygène (Reactive Oxygen Species)
TGF-β	Facteur de croissance transformant Bêta (Transforming Growth Factor Bêta)
U.A	Unité Arbitraire
UV	Ultraviolet

GLOSSAIRE

Anastomotique

Relatif à une anastomose, c'est-à dire une connexion entre deux vaisseaux.

Angiogenèse

Formation de nouveaux vaisseaux à partir de vaisseaux existants.

Conductivité

Caractérise la capacité des matériaux à diffuser la chaleur, conduire l'électricité ou laisser passer un fluide, sous l'effet d'un gradient de température, de potentiel ou de pression.

Convection

La convection décrit un déplacement de matière entraîné par le milieu fluide ou par une différence de potentiel dans le cas de matière chargée.

Dichroïque

Qui reflète seulement la lumière d'une longueur d'onde spécifique.

Diffusion

La diffusion moléculaire décrit un mécanisme de transport de matière sous l'effet de l'agitation thermique. Pour toutes températures différentes du zéro absolu, les atomes ou molécules, quel que soit leur état d'intégration (liquide, solide ou gaz), sont en mouvement. Le mouvement de ces particules mobiles est observable depuis des régions à forte concentration vers des régions à faible concentration, c'est-à dire dès lors qu'un gradient de concentration existe.

Ectoblastique

Relatif à l'ectoblaste, le feuillet cellulaire externe de l'embryon à partir duquel se créent la peau, les organes sensoriels et le système nerveux.

Entérale

Voie d'administration par le tube digestif.

Explant

Fragment d'organisme extrait d'un animal vivant et qui, placé dans un milieu favorable, y reprend sa croissance.

Hémiperméable

Se dit d'une membrane ne laissant passer que le solvant et pas les solutés.

Hypodermoclyse

Perfusion par voie sous-cutanée.

Injection

Introduction sous pression d'un liquide ou d'un gaz dans l'organisme.

Métalloprotéine

Protéine qui comporte un ou plusieurs cofacteurs métalliques.

Microdialyse

Technique d'échantillonnage à invasion minimale utilisée pour mesurer en continu les concentrations d'analytes libres et non liées dans le liquide extracellulaire de pratiquement tous les tissus.

Osmolalité

L'osmolalité d'une solution est la concentration molaire de toutes les substances osmotiquement actives présentes dans 1 kg de solvant. Une substance osmotiquement active est une substance qui, une fois en solution, a la propriété d'exercer une force attractive sur le solvant à travers une membrane hémiperméable.

Parentérale

Voie d'administration d'un médicament autre que la voie digestive, par opposition à la voie entérale.

Pavimenteux

Qui présente des cellules minces et allongées.

Perfusion / Infusion

Le terme perfusion peut avoir deux significations : il désigne d'une part une technique médicale consistant à administrer un composé par voie parentérale, et d'autre part un processus physiologique - la perfusion tissulaire - durant lequel un organe est alimenté en nutriments et en oxygène par le biais du sang ou de la lymphe. Le terme infusion peut également être utilisé afin de définir la perfusion.

Plexus

Réseau de vaisseaux anastomosés de façon complexe.

Radioisotope

Un radioisotope est une espèce atomique radioactive.

Rétrodialyse

Technique basée sur le principe de la microdialyse mais destinée à l'administration de composés dans un tissu.

Topique

Médicament qui agit uniquement à l'endroit où il est appliqué, sur la peau ou sur une muqueuse.

Vasculogénèse

Formation de néo-vaisseaux à partir de progéniteurs endothéliaux issus de cellules souches

INTRODUCTION

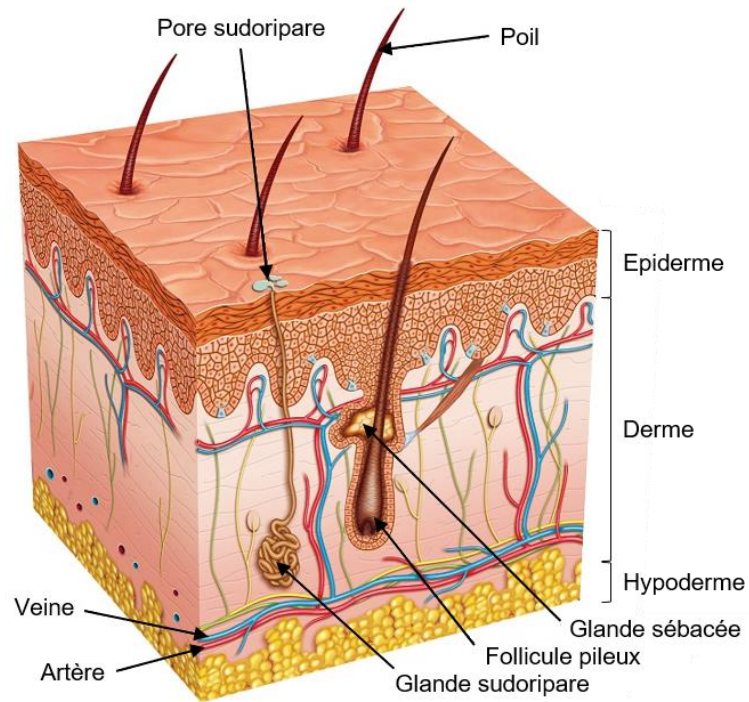


Figure 1. La structure de la peau humaine. Adaptée de https://m.simplyscience.ch/corps-et-sante-jeunes/articles/tatouages-comment-leur-faire-la-peau.html?_locale=fr.

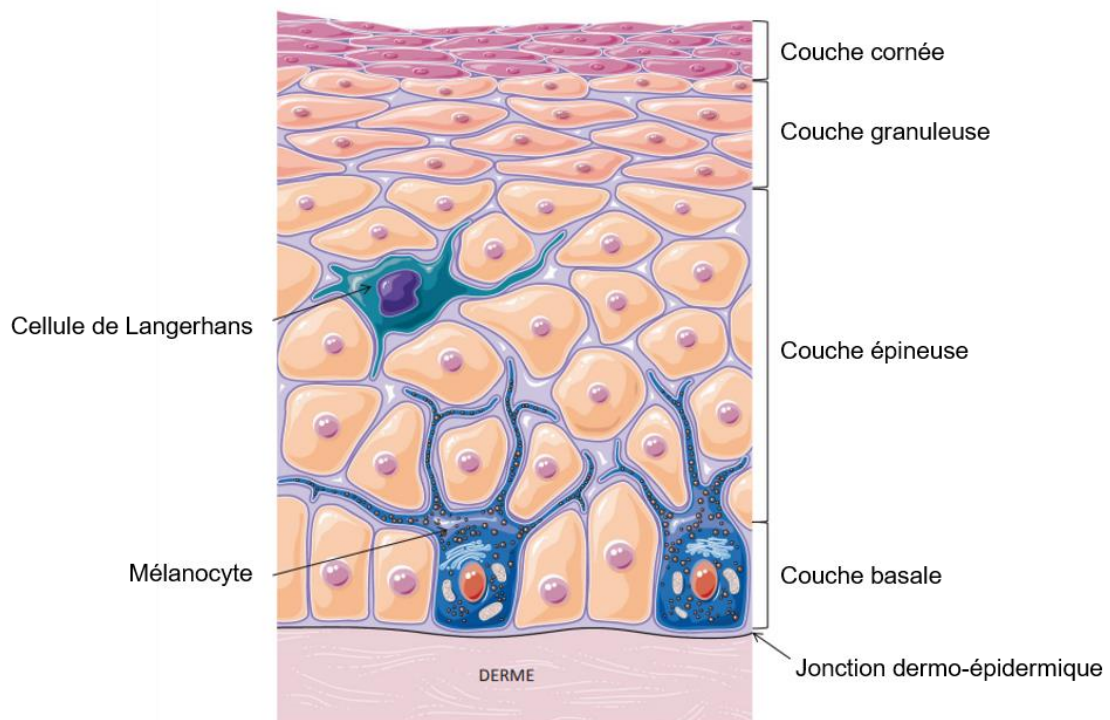


Figure 2. Les différentes couches de l'épiderme. Adaptée de (Abdallah et al., 2017).

Partie 1. Présentation générale de la peau humaine, de sa structure et de ses modèles d'étude *in vitro*

La peau est l'enveloppe qui recouvre toute la surface du corps, en continuité avec les muqueuses tapissant les cavités de l'organisme. Avec une surface d'environ 2 m² et un poids représentant environ 15 % du poids total d'un adulte, c'est le plus gros des organes du corps humain (Crickx, 2005 ; Kanitakis, 2002). Elle est constituée de trois compartiments : l'épiderme, le derme et l'hypoderme, ainsi que de différentes annexes cutanées telles que les follicules pileux, les glandes sébacées et les glandes sudoripares (**Figure 1**).

1. Les rôles de la peau

De par sa structure, la peau assure diverses fonctions vitales pour l'organisme. Son rôle principal est la protection contre les agressions extérieures, qu'elles soient d'origine physique comme des chocs ou des frottements par exemple, d'origine chimique ou microbienne. La peau permet également la régulation de la température du corps, grâce à son système vasculaire et à la production de la sueur par les glandes sudoripares. La peau possède de nombreux récepteurs nerveux, lui conférant une fonction sensorielle. Enfin, la peau exerce un rôle dans les réactions immunitaires (Crickx, 2005 ; Hussain et al., 2013).

2. La structure générale de la peau

2.1 L'épiderme

L'épiderme est un épithélium pavimenteux stratifié de quelques centaines de micromètres d'épaisseur, et constitue la couche la plus superficielle de la peau. On y retrouve quatre types cellulaires principaux : les kératinocytes, les mélanocytes, les cellules de Langerhans et les cellules de Merkel (Crickx, 2005 ; Kanitakis, 2002 ; Prost-Squarcioni, 2006).

Les kératinocytes sont des cellules d'origine ectoblastique qui représentent 80 % de la population cellulaire de l'épiderme. Ils assurent trois grandes fonctions : une fonction de barrière lorsqu'ils sont en phase de différenciation terminale (Candi et al., 2005 ; Matsui and Amagai, 2015), une protection contre les radiations lumineuses par phagocytose des mélanosomes de stade IV, et une cohésion de l'épiderme grâce à leur cytosquelette et à leur système de jonction (Crickx, 2005). Au cours de leur différenciation, les kératinocytes migrent de la profondeur vers la surface et changent de morphologie, ce qui confère à l'épiderme cette structure stratifiée, divisée en quatre couches (**Figure 2**).

La couche basale est la plus profonde de l'épiderme au niveau de laquelle les kératinocytes sont ancrés à la jonction dermo-épidermique grâce aux hémidesmosomes. Cette couche n'est composée que d'une seule assise cellulaire, avec des kératinocytes cylindriques au noyau allongé, alignés dans un axe perpendiculaire à la jonction dermo-épidermique. Ce compartiment est responsable de la régénération de l'épiderme avec des cellules souches, des cellules amplificatrices qui vont se différencier après s'être divisées ainsi que des cellules post-mitotiques qui restent en position basale (Crickx, 2005).

Au cours de leur différenciation, les kératinocytes vont devenir polygonaux avec des noyaux arrondis dans la couche épineuse, puis s'aplatir, leur axe devenant parallèle à la jonction dermo-épidermique, et former la couche granuleuse. Enfin, les cellules perdent leur noyau et leurs organites cytoplasmiques pour devenir des cornéocytes. La couche cornée ainsi formée est compacte en profondeur et se desquame en superficie (Candi et al., 2005 ; Matsui and Amagai, 2015). Le temps de migration des kératinocytes de la couche basale à la couche cornée est d'environ trois semaines.

Les mélanocytes représentent la deuxième population cellulaire de l'épiderme avec une cellule pour dix kératinocytes basaux (Prost-Squarcioni, 2006). Ce sont des cellules dendritiques originaires des crêtes neurales, que l'on retrouve dans la couche basale. Les mélanocytes synthétisent deux types de mélanines : les eumélanines et les phéomélanines, dans les mélanosomes. Le ratio entre ces deux types de mélanine donne à la peau sa pigmentation constitutive. Les eumélanines ont également un rôle photoprotecteur, tandis que les phéomélanines sont cancérigènes sous l'action des rayons lumineux. Une fois totalement mélanisés, les mélanosomes atteignent le stade IV et sont transférés aux kératinocytes par cytophagocytose (Crickx, 2005).

Les cellules de Langerhans représentent 3 à 8% des cellules de l'épiderme (Prost-Squarcioni, 2006). Ces cellules dendritiques d'origine hématopoïétique ont pour fonction de capturer les exo-antigènes présents sur la peau. Elles migrent ensuite à travers l'épithélium jusqu'au système lymphatique afin de les présenter aux lymphocytes T naïfs (Kanitakis, 2002).

Enfin, les cellules de Merkel constituent la population cellulaire minoritaire de l'épiderme. Ces cellules neuro-épithéliales se regroupent en amas de 10 à 80 cellules sous forme de disques : les corpuscules de Merkel. Elles ont un rôle de mécanorécepteur, et contribuent également au développement du système nerveux et des annexes cutanées (Freinkel and Woodley, 2001).

La transition entre l'épiderme et le derme se fait au niveau de la jonction dermo-épidermique, par une alternance de crêtes épidermiques et de papilles dermiques.

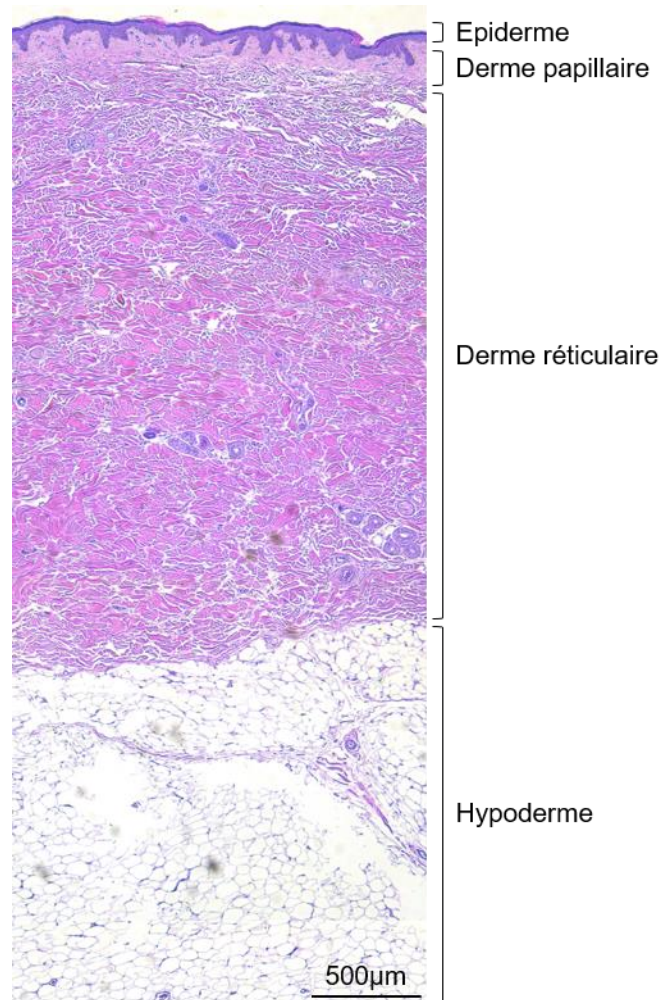


Figure 3. Coloration Hématoxyline et Eosine d'une coupe de peau humaine.

2.2 Le derme

Le derme est un tissu conjonctif d'origine mésoblastique, d'une épaisseur variant de 1 à 2 mm.

Les fibroblastes constituent la population cellulaire majoritaire dans le derme. Ces cellules d'origine mésenchymateuse ont pour fonction la synthèse et la dégradation des composants de la matrice extracellulaire. On retrouve aussi des cellules d'origine hématopoïétiques comme des mastocytes et des macrophages, impliqués dans le système phagocytaire mononucléaire (Crickx, 2005 ; Freinkel and Woodley, 2001 ; Kanitakis, 2002 ; Prost-Squarcioni, 2006).

Le derme est également constitué d'une abondante matrice extracellulaire composée principalement de fibres de collagène, de fibres élastiques et de substance fondamentale. Les fibres de collagène, majoritairement de type I et III, sont de longues fibres organisées en faisceaux. Elles sont rigides et non extensibles, ce qui confère à la peau sa résistance mécanique (Hussain et al., 2013). Les fibres élastiques au contraire, sont capables de s'allonger, puis de revenir à leur longueur initiale, apportant de l'élasticité à la peau. On distingue trois types de fibres élastiques : les fibres oxytalanes, les fibres d'élaunine et les fibres élastiques matures. La substance fondamentale, constituée de protéoglycanes, de glycosaminoglycanes et de glycoprotéines, se trouve entre les différentes fibres de collagène et les fibres élastiques et agit comme lubrifiant durant les mouvements (Freinkel and Woodley, 2001).

L'organisation de la matrice extracellulaire et la densité cellulaire dans le derme permet de distinguer deux zones : le derme papillaire et le derme réticulaire (**Figure 3**). Dans le derme papillaire, les fibres de collagène sont fines, lâches et orientées, le plus souvent perpendiculairement à la jonction dermo-épidermique. On y retrouve également des fibres oxytalanes, ainsi qu'une grande concentration de fibroblastes : c'est dans cette zone qu'ils prolifèrent le plus rapidement et où leur activité métabolique est la plus importante (Freinkel and Woodley, 2001). C'est aussi dans cette partie du derme que se trouvent les corpuscules de Meissner, des récepteurs sensoriels. Les fibres élaunines sont situées à la jonction entre le derme papillaire et le derme réticulaire. Ce dernier, situé sous le derme papillaire, est fait d'un tissu conjonctif dense où s'entremêlent des fibres de collagène plus épaisses et des fibres élastiques matures. On y trouve également des petits nerfs.

Il n'existe pas de limite franche entre le derme et l'hypoderme, la transition se fait par le passage d'un tissu conjonctif fibreux à un tissu conjonctif adipeux (**Figure 3**).

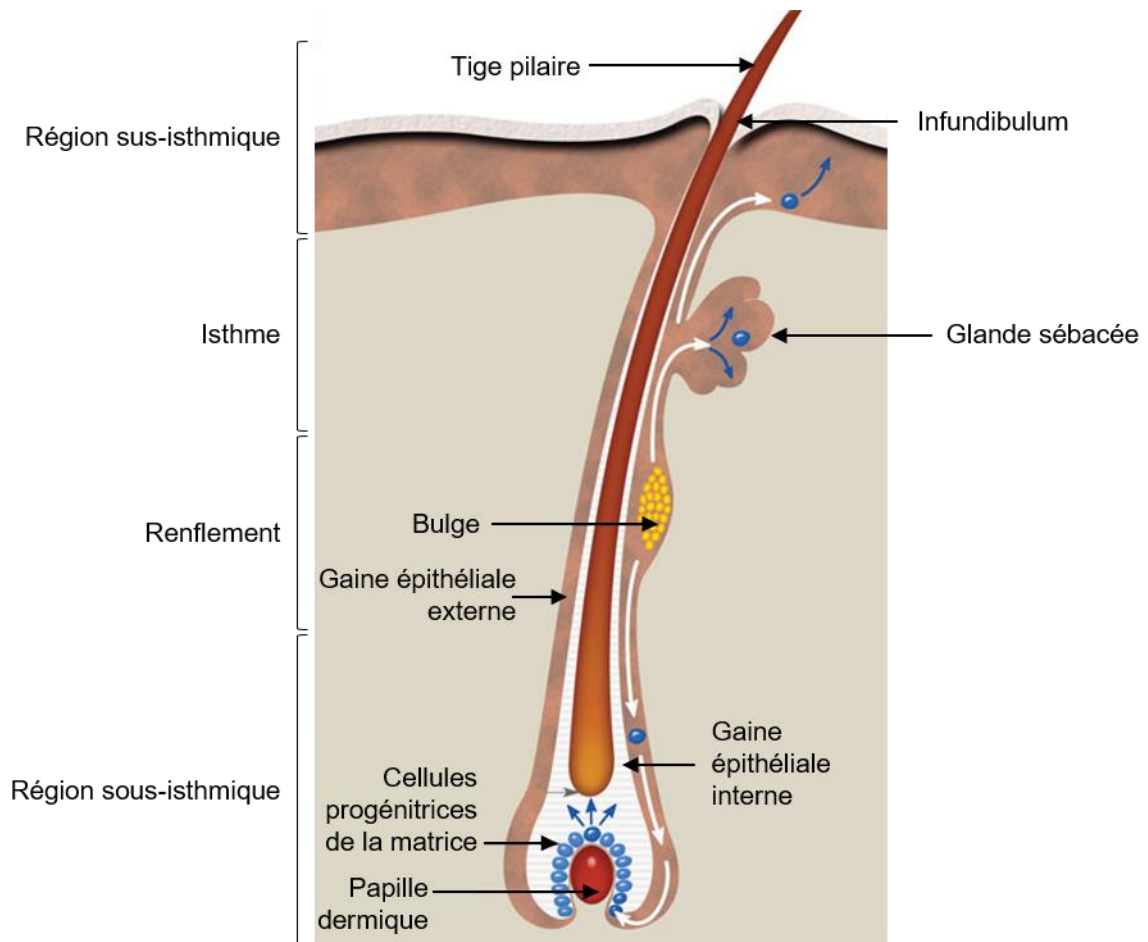


Figure 4. La structure du follicule pileux. Adaptée de <https://www.centre-clauderer.com/traitements/avancees-technologiques/fonctionnement-follicule-pileux/>.

2.3 L'hypoderme

L'hypoderme est un tissu conjonctif d'origine ectoblastique. Son épaisseur varie selon les individus et les zones du corps.

Il est constitué de lobes, subdivisés en lobules graisseux : les adipocytes. Ces lobules sont séparés par des septums interlobulaires contenant des cellules, principalement des fibroblastes et des mastocytes, et permettant le passage des vaisseaux et des nerfs jusqu'au derme (**Figure 3**).

Le tissu adipeux permet d'amortir les chocs, il agit comme un isolant, jouant ainsi un rôle primordial dans la thermorégulation du corps, et constitue une réserve d'énergie en stockant les lipides (Crickx, 2005).

2.4 Les annexes cutanées

Les annexes cutanées regroupent les phanères avec les poils et les ongles, ainsi que les glandes cutanées avec les glandes sudoripares et les glandes sébacées. Elles sont d'origine ectoblastique.

Le follicule pilo-sébacé est constitué d'une tige pileuse, de gaines épithéliales, d'une glande sébacée et d'un muscle arrecteur, qui entraîne l'horripilation du poil lorsqu'il se contracte (**Figure 4**) (Prost-Squarcioni, 2006). On retrouve des follicules sur l'ensemble du corps à l'exception de certaines zones comme les paumes des mains ou la plante des pieds. Il est divisé en quatre zones :

- La région sus-isthmique correspond à la zone où la tige pileuse émerge à la surface de la peau au niveau d'une cavité appelée l'infundibulum, en continuité avec l'épiderme,
- L'isthme est la zone où le follicule communique avec la glande sébacée,
- Le renflement, situé sous l'insertion du muscle arrecteur, contient le bulge où sont situées les cellules souches du follicule pileux,
- La région sous-isthmique correspond à la racine de poil, avec une papille dermique entourée d'une matrice et de deux gaines, les gaines épithéliales internes et externes.

La croissance de la tige pileuse suit des cycles composés de trois phases : anagène, catagène et télogène (Prost-Squarcioni, 2006).

Les glandes sébacées sont reliées aux follicules pileux (**Figure 4**). Ce sont des glandes tubulo-alvéolaires exocrines dont la portion sécrétrice se trouve dans le derme. Elles sont composées de sébocytes qui ont pour fonction la production et l'excrétion du sébum dans le canal excréteur, puis dans le follicule pileux. Le sébum permet de protéger la peau du dessèchement, et contribue à l'écosystème bactérien cutané (Crickx, 2005).

Les glandes sudoripares sont des glandes tubuleuses exocrines. On en distingue deux types : les glandes sudoripares apocrines et eccrines (Kanitakis 2002 ; Crickx 2005 ; Prost-Squarcioni 2006).

Les glandes sudoripares apocrines ne sont présentes que dans certaines régions de l'organisme, et sont toujours reliées à un follicule pileux. Elles sécrètent un produit gras et

opaque dans leur portion sécrétrice située dans l'hypoderme. Il vient ensuite se déverser dans le follicule pileux via le canal excréteur, en aval de la glande sébacée (**Figure 1**). Son rôle n'est pas connu.

On retrouve des glandes sudoripares eccrines sur toute la surface de la peau. Leur portion sécrétrice se trouve dans le derme profond ou dans l'hypoderme, et leur canal excréteur débouche à la surface de la peau au niveau d'un pore (**Figure 1**). Elles permettent la sécrétion d'un liquide aqueux, la sueur, qui est impliqué dans le contrôle de la température corporelle.

3. Les modèles d'études *in vitro* de la peau

Un modèle d'étude peut être défini comme une représentation de l'organisme à étudier qui ne récapitule pas tous les aspects de cet organisme, mais tend à s'en approcher. Ce modèle permet l'étude de phénomènes biologiques, en supposant que les résultats obtenus seront en partie similaires à ceux qui pourraient être obtenus à partir de l'organisme en question.

3.1 Intérêt des modèles d'études *in vitro*

Bien que la peau soit un organe facilement accessible, les expérimentations chez l'Homme sont limitées notamment pour des raisons éthiques, durant les premières phases de développement d'un composé. Ainsi, différents modèles d'étude ont été développés afin d'étudier les pathologies associées à la peau ou évaluer la toxicité ou l'innocuité de molécules d'intérêts thérapeutiques (Lebonvallet et al., 2010).

De nombreux modèles animaux existent. Les rongeurs sont particulièrement utilisés du fait de leur petite taille, leur faible coût et leur facilité de manipulation (Abd et al., 2016). Cependant, il a été démontré que la peau des rongeurs est beaucoup plus perméable que celle des humains (Schmook et al. 2001 ; Van Ravenzwaay and Leibold 2004). La peau de porc est la peau animale la plus proche de la peau humaine en termes de structure histologique, et reproduit notamment la fonction barrière, mais est difficile à manipuler (Abd et al., 2016).

Outre le manque de prédictibilité de ces modèles dû aux différences de structure et de composition entre les tissus, l'utilisation d'animaux pose également de nombreux problèmes éthiques et tend à être réduite. La règle des trois R a été élaborée en 1959 par W.M.S Russel et R.L Burch et constitue le fondement de la démarche éthique appliquée à l'expérimentation animale en Europe et Amérique du Nord. Au niveau Européen, cette règle a été énoncée pour la première fois dans la directive du 1er janvier 2013 (2010/63/UE). Le principe des « 3R » est le suivant :

- Réduire le nombre d'animaux en expérimentation, en se limitant aux seules expériences indispensables, en réduisant le nombre de répétitions, etc ...
- Raffiner l'expérimentation en réduisant au maximum l'inconfort, la douleur, la détresse ou l'angoisse subie par les animaux,
- Remplacer les modèles *in vivo* par des modèles *in vitro* ou des modèles mathématiques ou bio-informatiques.

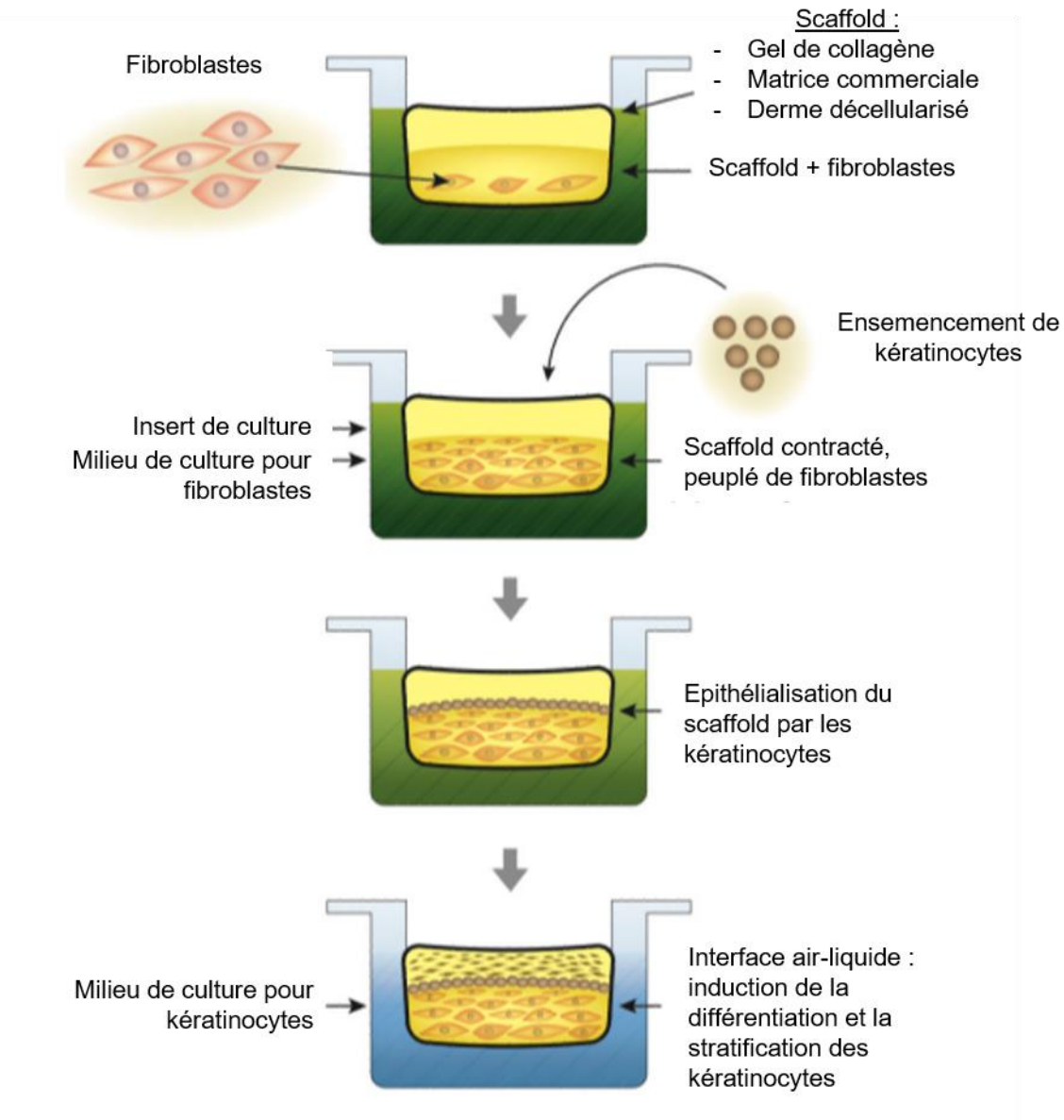


Figure 5. Processus de production d'un modèle de peau reconstruite. Adaptée de (Oh et al., 2013). 2013.

En ce qui concerne la production de produits cosmétiques, la commercialisation de produits dont les ingrédients auraient été testés sur les animaux est interdite en Europe depuis 2009.

Des modèles *in vitro* de complexité différentes ont donc été développés afin de reproduire la peau dans un contexte entièrement humain (Mathes et al., 2014).

3.2 Les cultures cellulaires en 2D

Les cultures cellulaires en monocouche représentent le modèle le plus simple pour mimer la peau, mais également un des moins coûteux et un des plus faciles à mettre en œuvre. Les cellules cultivées peuvent être des cellules primaires, ou bien issues de lignées cellulaires.

Les deux types cellulaires majoritaires dans la peau, les kératinocytes et les fibroblastes, sont les principaux types cellulaires utilisés pour ce type de culture.

La culture de kératinocytes permet d'effectuer des tests de cytotoxicité ou d'évaluer l'efficacité de composés, mais également de modéliser l'épiderme, d'étudier le principe de différenciation, ou bien de comprendre les mécanismes de cicatrisation (Lebonvallet et al., 2010).

La culture de fibroblastes quant à elle, permet notamment l'évaluation des mécanismes de synthèse des composants de la matrice extracellulaire, et l'étude du rôle des fibroblastes dans les processus de vieillissement cutané ou de cicatrisation (Lebonvallet et al. 2010).

Afin de mieux comprendre les interactions entre les différents types cellulaires et le rôle de chacun, des modèles de coculture sont également développés. Les principaux sont des cocultures de kératinocytes et de mélanocytes (Lei et al., 2002), de kératinocytes et de neurones (Ulmann et al., 2007) ou de kératinocytes et de fibroblastes (Harrison et al., 2005 ; Li et al., 2009).

3.3 Les modèles de peau reconstruits

Les modèles reconstruits sont à un niveau supérieur en termes de complexité par rapport aux cultures cellulaires en deux dimensions, puisqu'ils permettent d'étudier les interactions entre cellules/matrices ou cellules/cellules dans un environnement en trois dimensions. Ces modèles peuvent être utilisés pour tester l'efficacité ou l'innocuité de molécules thérapeutiques appliquées en topique ou via le milieu de culture, mais également dans le cadre de la médecine régénérative comme substitut de peau (Mathes et al. 2014 ; Rodrigues Neves and Gibbs 2018 ; Augustine 2018).

Le derme reconstruit est constitué de fibroblastes ensemencés dans une matrice. Cette matrice peut être un simple réseau de fibres de collagène, des matrices commerciales développées spécifiquement pour cette application, ou bien du derme désépidermisé et décellularisé obtenu à partir d'une biopsie de peau humaine.

L'épiderme reconstruit quant à lui, présente une stratification différenciée telle qu'observée *in vivo*. Pour ce faire, des kératinocytes sont cultivés à l'interface air-liquide.

La peau peut également être reconstruite dans son ensemble, en combinant les deux modèles décrits précédemment. Dans un premier temps, des fibroblastes sont ensemencés dans une matrice. Après environ 3 jours de culture dans un milieu adapté, durant lesquels les fibroblastes vont adhérer au collagène de la matrice entraînant la contraction du gel, des kératinocytes vont être déposés à sa surface.

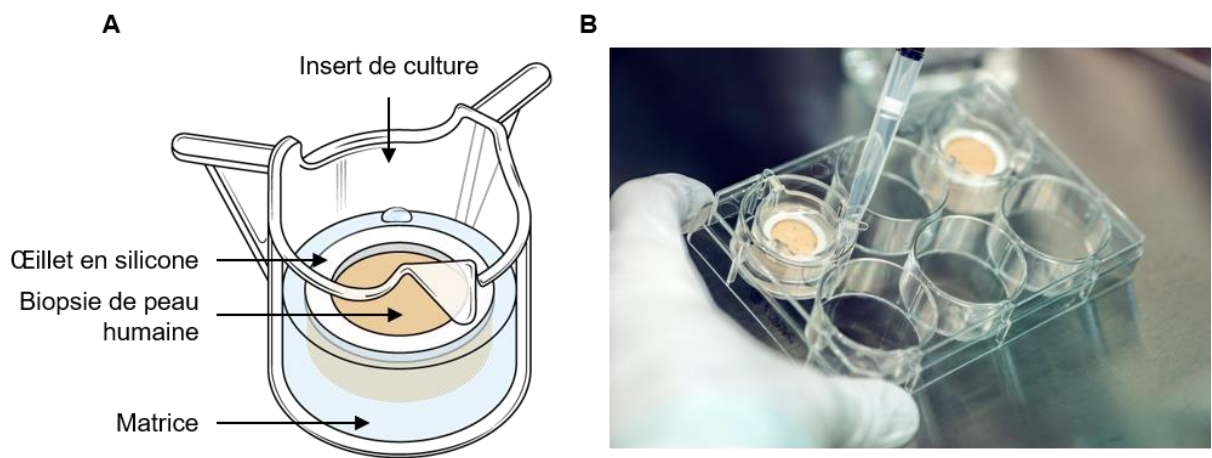


Figure 6. Le modèle de peau humaine *ex vivo* NativeSkin®. (A) Représentation schématique du modèle NativeSkin® et de ses différents constituants. **(B)** Photographie du modèle NativeSkin® en culture.

Le modèle est ensuite cultivé pendant environ 4 jours en immersion dans un milieu favorisant la croissance des kératinocytes. Puis, le modèle est maintenu en culture à l'interface air-liquide pour induire la différenciation stratifiée de l'épiderme (**Figure 5**) (Bernerd, 2005 ; Mathes et al., 2014 ; Oh et al., 2013 ; Rodrigues Neves and Gibbs, 2018).

D'autres types cellulaires peuvent être ajoutés lors de la production de la peau reconstruite afin de complexifier encore le modèle. Par exemple, l'ajout de mélanocytes permet d'obtenir un modèle pigmenté, tandis que l'ajout de cellules de Langerhans ou de macrophages peut permettre l'obtention d'un modèle immunocompétent (Mathes et al., 2014). Des neurones peuvent également être introduits afin d'obtenir un modèle de peau innervé (Muller et al., 2018), ou des cellules endothéliales afin d'obtenir un modèle vascularisé (Black et al. 1998 ; Sahota et al. 2003).

Les modèles de peau reconstruits peuvent également être produits par bio-impression 3D : les différents types cellulaires contenus dans un hydrogel généralement composé de collagène sont imprimés couche par couche. Cette technique permet d'obtenir un tissu de façon automatique, standardisée et très reproductible (Augustine 2018 ; Ishack and Lipner 2020).

3.4 Les explants de peau humaine *ex vivo* et le modèle NativeSkin®

L'explant de peau humaine *ex vivo* est le modèle organotypique le plus complexe et le plus proche de la peau humaine *in vivo*, puisqu'il est produit directement à partir de peau humaine fraîche. Cette peau provient de déchets opératoires de chirurgies plastiques, et peut être prélevée au niveau du ventre, du dos, des cuisses ou des bras principalement. L'avantage de ce modèle est qu'il est représentatif de la maturité et de toute la complexité du tissu avec les différentes couches de la peau, notamment la couche cornée ainsi que les annexes cutanées et tous les types cellulaires retrouvés *in vivo*. Ainsi, il permet d'étudier la réaction de la peau à un traitement dans son ensemble. L'utilisation de peau humaine donne également la possibilité de réaliser des tests sur un donneur précis, dont on peut choisir le sexe, le phototype ou bien l'âge. Contrairement aux modèles de peau reconstruite qui nécessitent des semaines de production, les explants de peau *ex vivo* sont utilisables très rapidement, dans les heures qui suivent la chirurgie. Après récupération, la peau est nettoyée, puis des biopsies sont produites. Celles-ci sont ensuite cultivées en fonction de l'application souhaitée : les biopsies peuvent être conservées en intégralité, elles peuvent être dégraissées pour ne conserver que le derme et l'épiderme, ou bien ces deux couches peuvent être séparées (Lebonvallet et al., 2010).

Le modèle NativeSkin® développé et commercialisé par la société Genoskin est un modèle d'explant de peau *ex vivo* constitué des deux couches supérieures de la peau : l'épiderme et le derme. Il est composé d'une biopsie de peau humaine fraîche issue de prélèvements de peau, collectés lors d'abdominoplasties le plus souvent. Ces biopsies circulaires, d'un diamètre pouvant aller de 8 à 23 mm, sont maintenues à l'interface air-liquide dans une matrice nourricière semi-solide, dans un insert de culture (**Figure 6**). Le modèle est cultivé dans des conditions de culture classiques (37°C, 5% de CO₂, humidité maximale) dans une plaque multi-puits dans laquelle un milieu de culture spécialement développé est déposé.

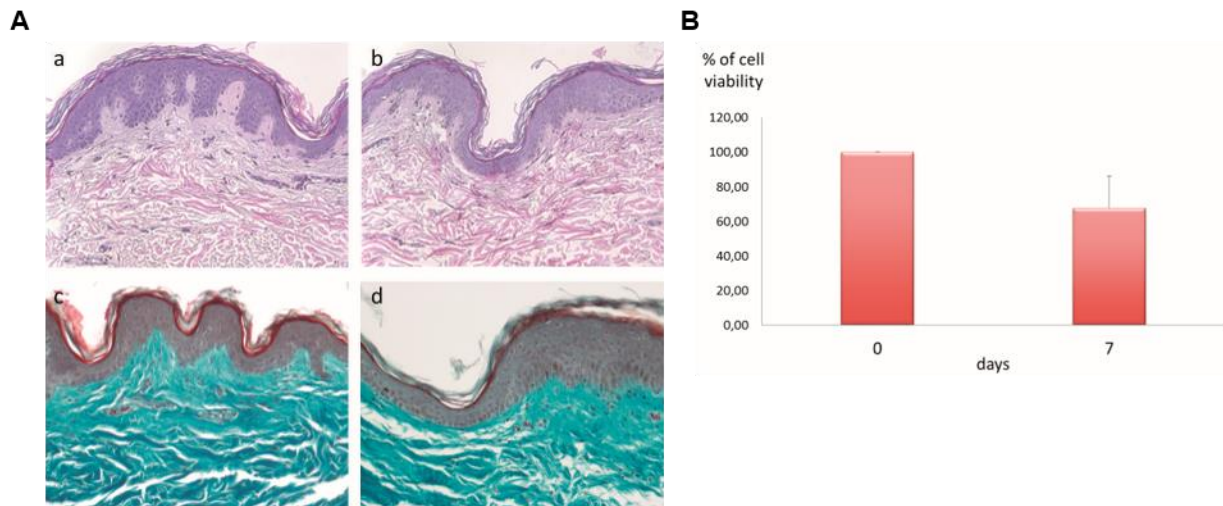


Figure 7. Caractérisation du modèle NativeSkin®. (A) Caractérisation histologique du modèle NativeSkin®. Les analyses ont été réalisées sur des coupes paraffine de 5µm d'épaisseur. (a) et (b) : Coloration Hématoxyline et Eosine. (c) et (d) : Coloration Trichrome de Masson. Les analyses ont été réalisées à 0 (a et c) et 7 jours de culture (b et d). (B) Mesure de la viabilité cellulaire par test au MTT réalisé à 0 et 7 jours de culture. La viabilité à 7 jours de culture est exprimée en pourcentage par rapport à la viabilité mesurée à 0 jour de culture. Adaptée de (De Wever et al., 2015).

Le modèle peut être traité par application topique, notamment grâce à l'anneau en silicone collé sur sa surface qui permet d'éviter la diffusion latérale du composé appliqué. Il peut également être traité en « systémique » par ajout du composé dans le milieu de culture qui diffuse passivement à travers la membrane poreuse de l'insert.

Des analyses histologiques et biochimiques réalisées sur le modèle NativeSkin® après sept jours de culture ont révélé la préservation de différentes caractéristiques de la peau normale, telles que la structure des différentes couches de la peau et la teneur en collagène du derme (**Figure 7**). Une viabilité cellulaire équivalente à environ 70 % de la viabilité cellulaire de la peau fraîche a été mesurée. La présence de cellules de Langerhans et de cellules T résidentes a également été démontrée, révélant une certaine immunocompétence du modèle. Enfin, des études ont prouvé que les mélanocytes présents dans le modèle conservaient leur capacité à produire de la mélanine même après plusieurs jours de culture (De Wever et al., 2015).

Différentes études réalisées sur ce modèle ont démontré sa pertinence dans le cadre de l'évaluation des effets de composés thérapeutiques appliqués en topique (Norsgaard et al. 2014 ; Narda et al. 2020), mais également pour l'étude des effets de stress tels qu'une exposition aux UV (Calapre et al., 2016), ou des défauts de barrière (Duracher et al., 2015). Genoskin propose également un modèle avec hypoderme - HypoSkin® - permettant la réalisation d'injections sous-cutanées (données non publiées), ainsi qu'un modèle de psoriasis - InflammSkin® - afin d'évaluer l'efficacité de traitements (Jardet et al., 2020).

3.5 Les limites de ces modèles

Bien que ces modèles *in vitro* présentent de nombreux avantages, leur utilisation comporte aussi de nombreuses limites.

Les cultures cellulaires en 2D sont des modèles faciles à produire mais ne permettent pas de reproduire la complexité de la peau et sa structure en trois dimensions.

Les modèles de peaux reconstruites sont relativement longs à développer puisqu'ils nécessitent plusieurs semaines de culture avant de pouvoir être utilisés. De plus, il a été démontré que leur barrière était plus perméable que celle de la vraie peau humaine (Schreiber et al. 2005 ; Schäfer-Korting et al. 2008) : leur utilisation pour des études de la fonction barrière ou pour l'évaluation de la pénétration de composés est donc limitée. De plus, bien qu'ils reproduisent la structure en trois dimensions du tissu et la stratification différenciée de l'épiderme, ils ne reproduisent tout de même pas toute la complexité du tissu humain puisqu'ils ne comprennent pas tous les types cellulaires, ni les annexes cutanées (Lebonvallet et al. 2010 ; Mathes et al. 2014).

Les explants de peau humaine comportent de nombreuses variabilités d'un donneur à l'autre, ce qui est pertinent pour des analyses statistiques sur une population large mais peut également être un problème pour des études fondamentales.

Outre ces limites, un des problèmes majeurs liés à l'utilisation des modèles organotypiques, tels que les peaux reconstruites ou les explants de peau, est que les échanges sont limités. En effet, ces modèles ne reproduisent pas le système vasculaire ou lymphatique des tissus *in vivo*. L'approvisionnement en nutriments, en oxygène ou en médicament est limité à la diffusion passive du milieu de culture dans les modèles (Lebonvallet et al. 2010 ; Mathes et al. 2014). Si l'on prend l'exemple de l'oxygène qui a une limite de profondeur de diffusion moyenne de 100 à 200 μm (Rouwkema et al., 2008), cela signifie que les cellules présentes dans les modèles à une distance de plus de 200 μm du milieu de culture ne sont pas ou peu approvisionnées. De plus, l'absence de système lymphatique ne permet pas l'élimination des déchets. Cela limite grandement la durée de vie des modèles, et leur pertinence pour l'évaluation de l'efficacité ou de la toxicité de molécules administrés en systémique.

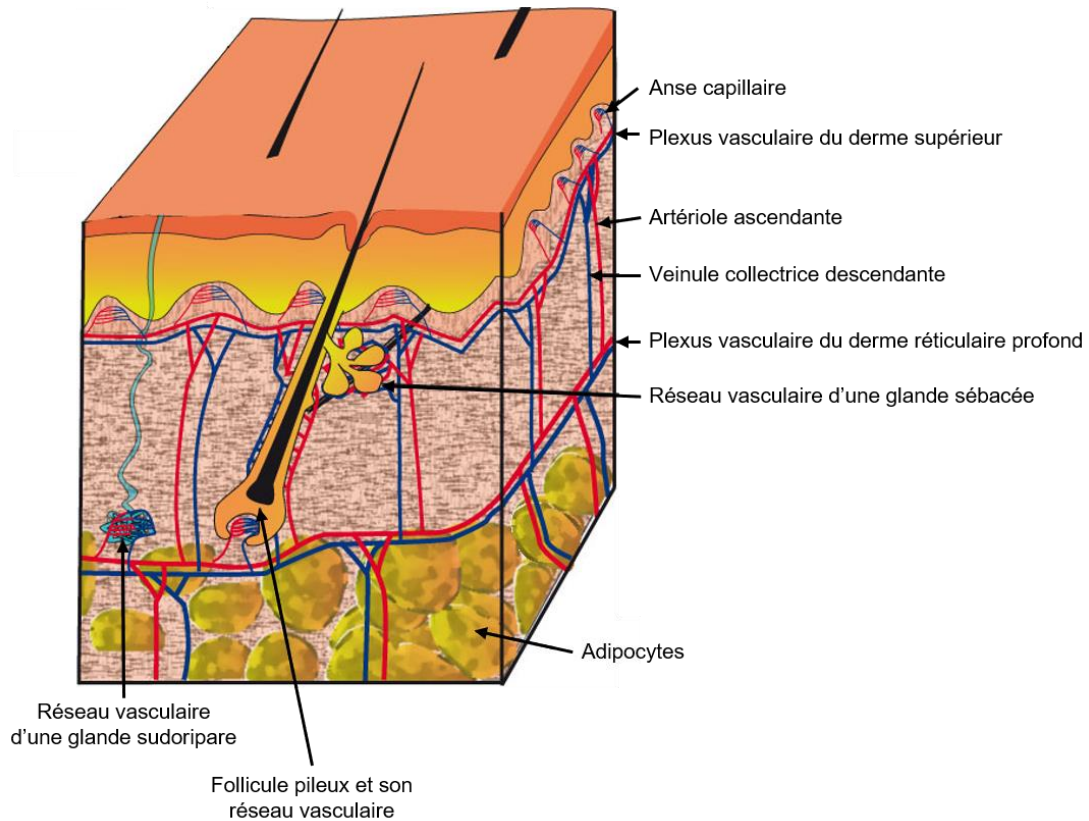


Figure 8. Le réseau vasculaire cutané. Adaptée de <http://biologiedelapeau.fr/spip.php?article=29>.

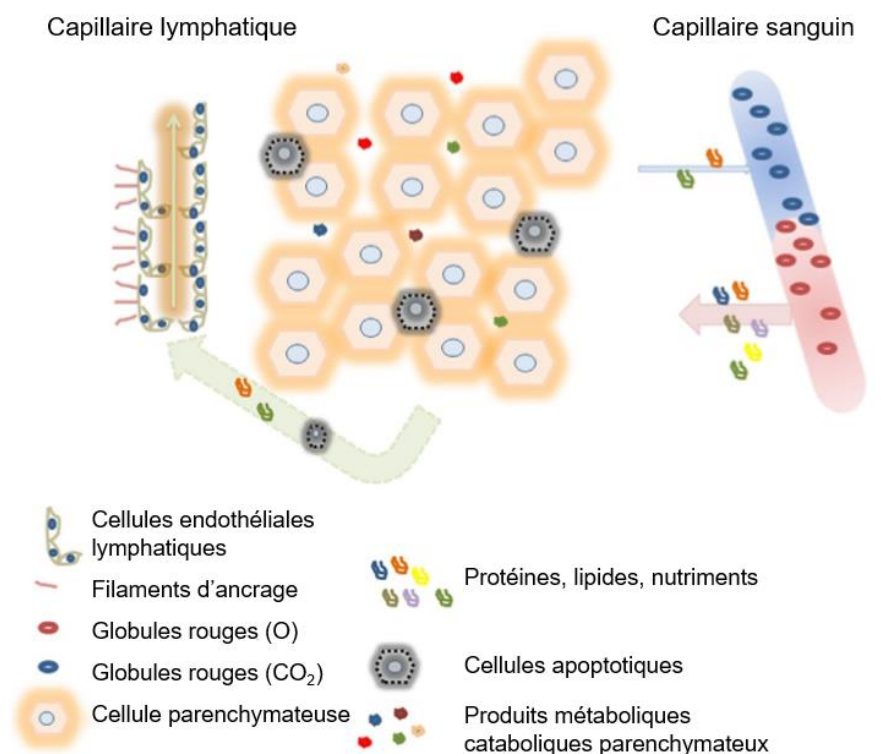


Figure 9. Les échanges entre le système vasculaire, le tissu et le système lymphatique. Adaptée de (Santambrogio, 2018).

Partie 2. La microcirculation cutanée

La microcirculation forme une architecture qui comprend le système vasculaire avec des artères et des veines ainsi que des artérioles et des veinules reliées par des capillaires, mais aussi le système lymphatique. Dans la peau, seuls l'hypoderme et le derme sont vascularisés, par un réseau sanguin et lymphatique très structuré. L'épiderme, comme tout épithélium, n'est pas vascularisé (**Figure 8**).

1. Les rôles de la microcirculation

Les réseaux sanguins et lymphatiques fonctionnent de manière connectée et complémentaire, afin d'assurer diverses fonctions vitales de l'organisme telles que la nutrition et l'oxygénation du tissu, l'élimination des déchets (**Figure 9**), la maintenance de l'équilibre des fluides et de la pression dans le tissu, le bon fonctionnement immunologique, ou la thermorégulation du corps. C'est également par la microcirculation que de nombreux médicaments sont administrés dans l'organisme.

Le sang est composé à 55 % de plasma, à 44 % d'érythrocytes, aussi appelés globules rouges, et à 1% de plaquettes et de leucocytes, aussi appelées globules blancs. La composition de la lymphe, quant à elle, est très variable et dépend de la composition du fluide interstitiel avoisinant (Santambrogio, 2018).

1.1 L'approvisionnement en nutriments et en oxygène et l'élimination des déchets

Le système artériel permet, via le sang, l'approvisionnement des cellules de l'épiderme, du derme, de l'hypoderme et des annexes cutanés en nutriments et en oxygène (**Figure 9**). Le système veineux quant à lui, permet l'élimination du dioxyde de carbone et des déchets métaboliques (**Figure 9**).

Les nutriments et autres composés essentiels à la physiologie du tissu sont contenus dans le plasma, constitué de protéines, d'enzymes, de nutriments, d'hormones, de gaz et d'électrolytes.

Le transport de l'oxygène des poumons vers les tissus est assuré à 95% par les globules rouges, le reste étant effectué par le plasma (Bain, 2017). Ces cellules ont une forme de disque évidé, constituant une grande surface d'échange pour l'oxygène. De plus, l'absence de noyau et d'organelles leur confère une flexibilité et une déformabilité permettant leur passage à travers la paroi des capillaires. Leur diamètre étant supérieur à celui des capillaires, elles sont obligées de se déformer et de s'écraser afin d'évoluer dans les vaisseaux, ce qui favoriserait également le transfert de l'oxygène vers le tissu (Bain, 2017). Les globules rouges sont constitués majoritairement d'hémoglobine, une métalloprotéine composée de deux sous-unités α -globine et de deux sous-unités β -globine. Chacune de ces unités globines est associée à un groupe hème qui contient un cation de fer, capable de s'associer à l'oxygène.

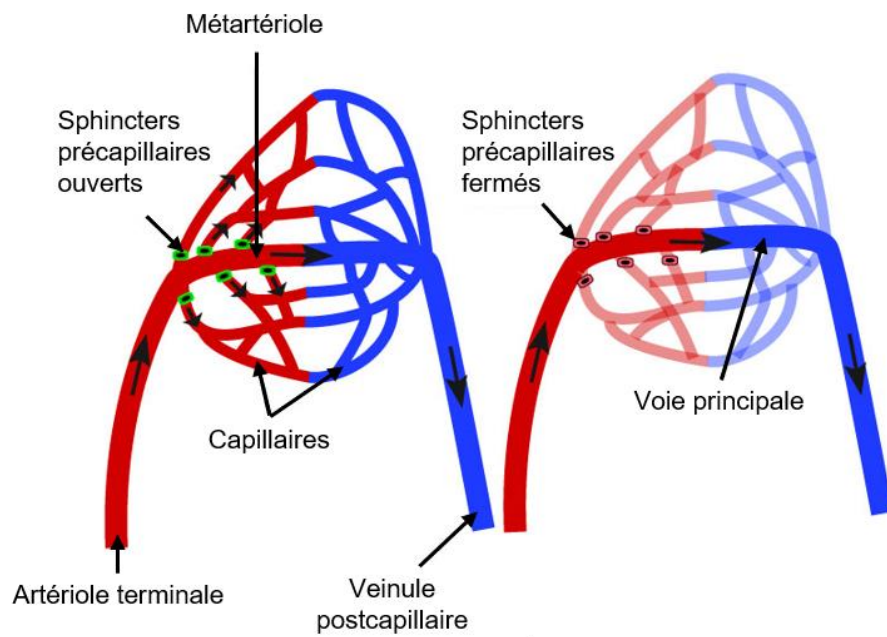


Figure 10. Les anses capillaires. Adaptée de <http://biologiedelapeau.fr/spip.php?article=29>.

Le taux d'oxygène dans le sang, appelé saturation en oxygène, représente le pourcentage d'hémoglobines du sang oxygénées après le passage dans les poumons, et est compris entre 95 et 100% chez un individu en bonne santé.

Les globules rouges assurent également à 15 % le transport du dioxyde de carbone des tissus vers les poumons, grâce à la fixation de ce dernier aux extrémités N-terminales des chaînes α -globine de l'hémoglobine (Bain, 2017).

1.2 La maintenance de l'équilibre des fluides et de la pression dans le tissu

Le système lymphatique joue un rôle important dans la régulation de la pression du tissu et l'élimination des fluides extracellulaires (Olszewski, 2003 ; Santambrogio, 2018 ; Skobe and Detmar, 2000). Il agit de façon complémentaire avec le système sanguin.

En un jour, 50% des protéines présentes dans le sang s'échappent des vaisseaux et ne peuvent plus y rentrer. Cette extravasation peut entraîner une diminution du volume plasmatique et une augmentation de la pression tissulaire. Le système lymphatique permet le drainage du fluide en excès, et le retour des macromolécules dans la circulation sanguine.

L'élimination du fluide extracellulaire permet également de maintenir une distance minimale entre les vaisseaux et les cellules, et donc un approvisionnement suffisant en nutriments et en oxygène par le sang.

1.3 La thermorégulation du corps

Le volume sanguin cutané est largement supérieur aux besoins métaboliques du tissu, le flux nutritionnel ne représentant que 20% du débit sanguin cutané. Les 80% restant sont dédiés à la thermorégulation. En cas d'hypothermie, le tonus sympathique va provoquer la vasoconstriction des artéioles du derme, et la fermeture des sphincters à l'entrée des anses capillaires (**Figure 10**). La circulation sanguine est donc localisée principalement au niveau de l'hypoderme, ce dernier jouant un rôle d'isolant. Les déperditions de chaleur du sang vers le milieu extérieur à la surface sont ainsi limitées. En cas d'hypothermie et donc de vasoconstriction prolongée, la peau n'est plus suffisamment approvisionnée en oxygène, entraînant la formation de gelures. Au contraire, en cas d'hyperthermie, la vasodilatation permet d'augmenter le débit sanguin près de la surface de la peau et d'accentuer la déperdition de chaleur par convection ou rayonnement (Charkoudian, 2003; Crickx, 2005; Kellogg, 2010).

1.4 Le bon fonctionnement immunologique

Les globules blancs présents dans le sang font partie du système de défense de l'organisme et sont divisés en trois familles de cellules : les granulocytes, les monocytes et les lymphocytes. Les granulocytes et les monocytes ont pour rôle la défense l'organisme contre les invasions microbiennes tandis que les lymphocytes sont responsables des réponses immunitaires cellulaires et humorales spécifiques (Gordon-Smith 2013 ; Bain 2017).

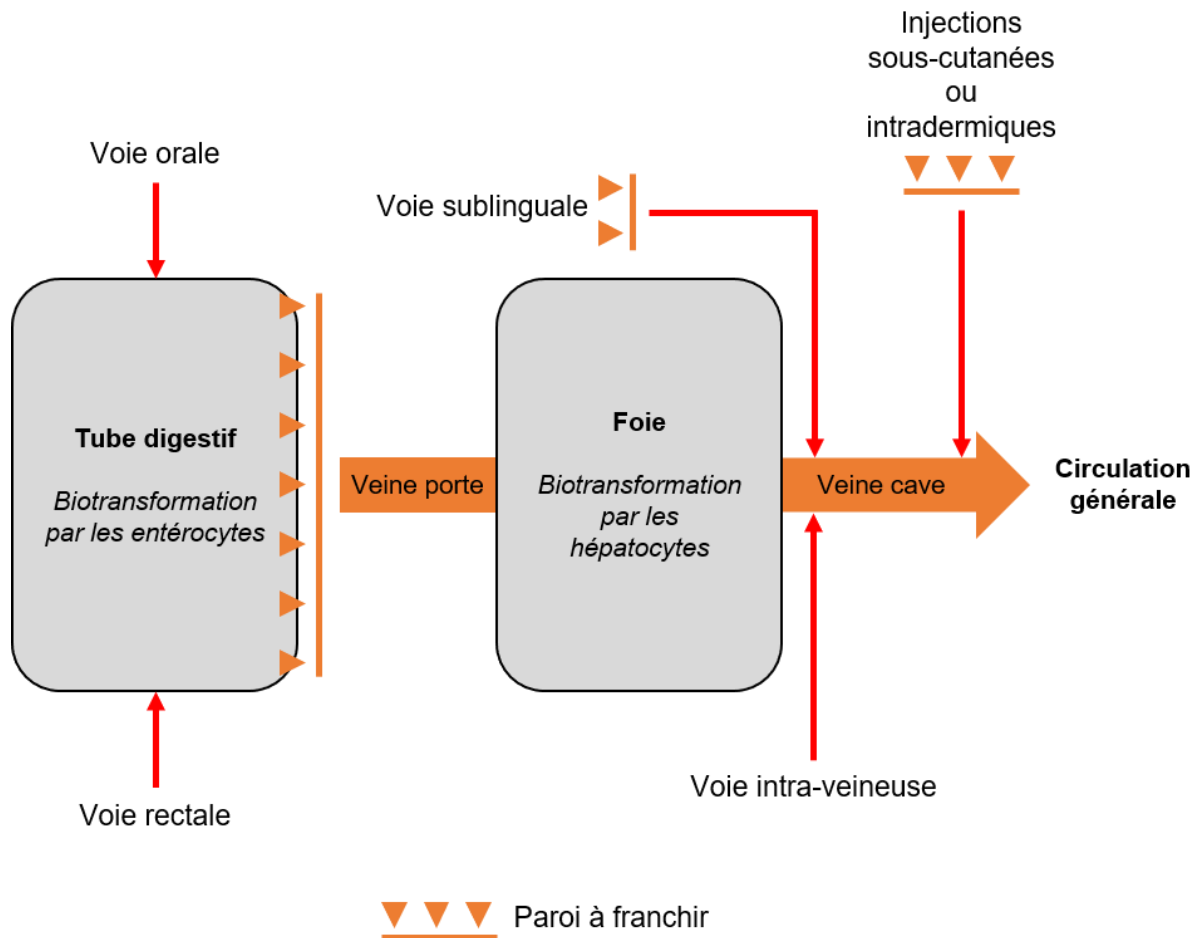


Figure 11. Les différentes voies d'administration systémiques d'un médicament. Adaptée de <https://pharmacomedicale.org/pharmacologie/pharmacocinetique/36-etapes-du-devenir-du-medicament/74-absorption>.

Les granulocytes sont caractérisés par les granules présentes dans leur cytoplasme qui régissent les mécanismes de destruction spécifiques et la fonction de signalisation des cellules. Ces cellules migrent dans les tissus depuis les vaisseaux suite à une infection ou une inflammation. Les granulocytes peuvent être divisés en trois catégories : les éosinophiles, les basophiles et les neutrophiles. Les éosinophiles ont pour rôle principal la protection contre les parasites en déversant les enzymes contenues dans leurs granules. Les basophiles sont impliqués dans les réactions allergiques, l'anaphylaxie et l'inflammation chronique, de par l'histamine qu'ils sécrètent. Enfin, les neutrophiles phagocytent, détruisent et digèrent les bactéries.

Les monocytes, après migration dans les tissus, se différencient en macrophage. Ils ont pour fonction la défense contre les microorganismes qu'ils phagocytent, mais aussi un rôle de cellules présentatrices d'antigènes.

Les lymphocytes peuvent être divisés en deux catégories : les lymphocytes T responsables de l'immunité cellulaire et les lymphocytes B responsables de l'immunité humorale.

La lymphe est aussi impliquée dans la réponse de l'organisme aux infections, en dirigeant les cellules de Langerhans présentatrices d'antigènes vers les ganglions lymphatiques, nécessaire au développement de l'immunité (Olszewski, 2003).

1.5 L'administration de médicaments

Une voie d'administration désigne la méthode par laquelle un médicament est administré dans l'organisme. On en distingue deux types : la voie systémique, pour laquelle le médicament emprunte la circulation sanguine pour atteindre son site d'action, et la voie locale, pour laquelle le médicament est directement appliqué sur son lieu d'action (Verma et al., 2010).

Lors d'une administration systémique, le médicament peut être pris par voie entérale ou parentérale (**Figure 11**).

La voie entérale désigne les modes d'administration pour lesquels le médicament devra passer la paroi du tube digestive, puis le système porte hépatique et enfin le foie avant de rejoindre la circulation générale. Cette voie regroupe les administrations orales et rectales. La voie parentérale désigne les modes d'administration pour lesquels le médicament rejoint la circulation générale, soit directement, lors d'une injection intra-veineuse par exemple, soit en traversant la paroi des capillaires, dans le cas d'injections sous-cutanées ou intramusculaires ou bien par voie nasale ou sublinguale.

Dans le cas où le médicament n'est pas administré directement dans la circulation générale par injection intra-veineuse, celui-ci va passer par une étape d'absorption, qui va déterminer sa biodisponibilité, c'est-à-dire la proportion de ce médicament qui va atteindre le sang sous forme inchangée. En effet, celui-ci doit traverser la paroi intestinale, et subir des biotransformations dues à l'activité enzymatique des entérocytes dans l'intestin, et des hépatocytes dans le foie.

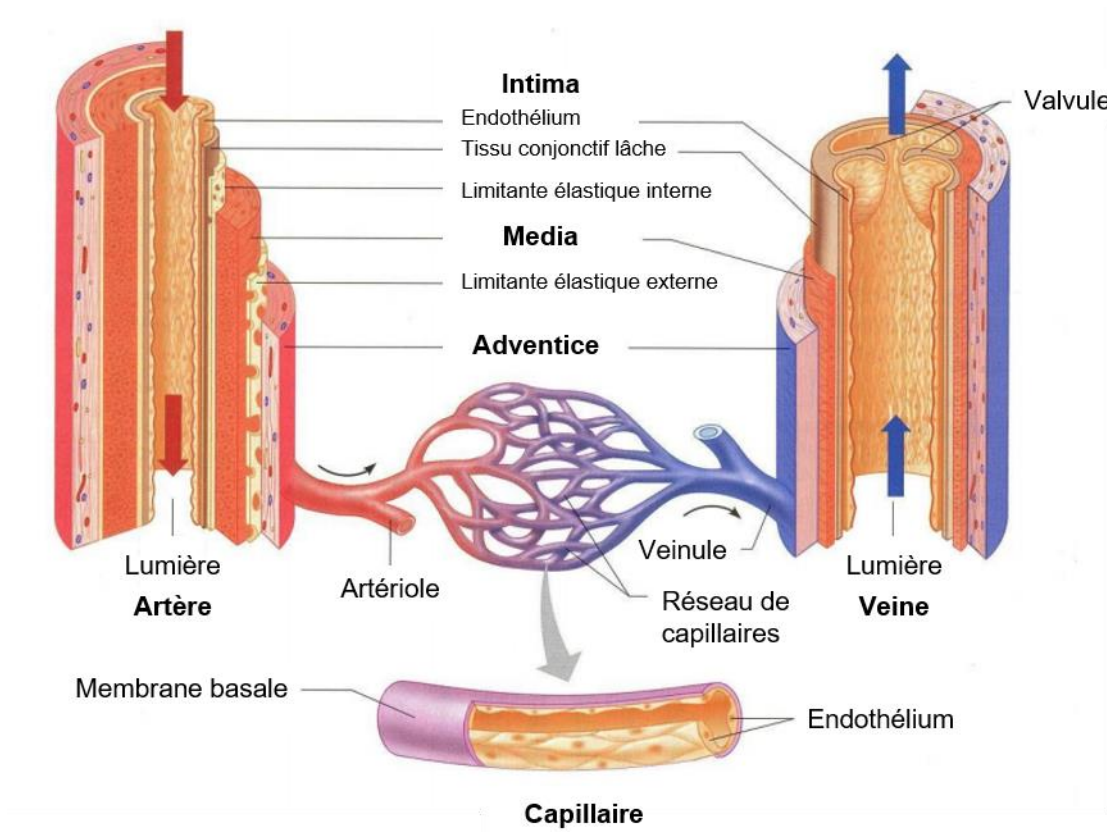


Figure 12. La structure des vaisseaux. Adaptée de <http://www.ifsidijon.info/v2/wp-content/uploads/2015/10/2016-Systeme-cardiovasculaire-les-vasseaux.pdf>.

Après avoir atteint la circulation générale, le médicament est distribué dans les tissus et les organes. Cette distribution est cruciale car elle détermine l'action pharmacologique et les effets toxiques potentiels du médicament (Lanao and Fraile, 2005). Différents facteurs entrent en jeu lors de la distribution tissulaire d'un médicament, tels que ses caractéristiques physico-chimiques (masse molaire, lipophilie, pKa ...), sa concentration plasmatique sous forme libre, le débit sanguin ou bien la composition du tissu avec lequel le médicament en question peut avoir des affinités plus ou moins fortes. La concentration plasmatique sous forme libre et donc active est quant à elle dépendante du phénomène de liaison des médicaments aux protéines. En effet, certaines protéines plasmatiques fixent préférentiellement les médicaments, comme l'albumine, les lipoprotéines ou les immunoglobulines.

2. La structure générale de la microcirculation cutanée

2.1 Le système sanguin

Le système artériel cutané est formé de trois plexus parallèles à la surface de la peau (**Figure 8**) (Braverman, 2000; Camargo and Gemperli, 2018; Crickx, 2005; Kanitakis, 2002).

Le premier plexus est situé dans la partie profonde de l'hypoderme et est originaire des artères perforantes des muscles sous-jacents. De ce plexus partent des artères, traversant l'hypoderme en donnant naissance à des collatérales qui permettent l'approvisionnement des lobules graisseux, des follicules pileux et des glandes sudoripares.

Ces artères se rejoignent au niveau du derme réticulaire profond pour former le deuxième plexus. Des artéioles dites « en candélabre » remontent de ce plexus à la perpendiculaire. Des branches débouchent de ces artéioles afin d'approvisionner le derme réticulaire et les annexes cutanées qu'il contient.

Un troisième réseau anastomotique est formé par ces artéioles à la jonction entre le derme réticulaire et le derme papillaire, environ 1 à 2 mm sous la surface de l'épiderme (Braverman, 2000). C'est de ce plexus que partent les anses capillaires, constituées d'artéioles pré-capillaires ascendantes, de capillaires veineux et artériels formant un virage « en épingle », puis de veinules post-capillaires descendantes. Ces veinules débouchent ensuite sur le réseau veineux, présentant la même architecture que le réseau artériel. On distingue une anse capillaire par papille dermique. L'épiderme, non vascularisé, est approvisionné par imbibition via ces anses.

La paroi des vaisseaux du système artériel est composée de trois couches, entourant une lumière ronde (**Figure 12**). Le diamètre des vaisseaux diminue selon leur type : les artères ont un diamètre externe compris entre 50 et 100 μm avec une paroi allant de 10 à 15 μm , contre 15 à 30 μm de diamètre pour les artéioles, avec des parois de 4 à 5 μm . Les capillaires quant à eux, ont un diamètre allant de 5 à 8 μm avec une paroi très fine, de moins d'un micromètre, et leur longueur varie entre 0,5 et 1 mm (Braverman, 2000; Kanitakis, 2002).

L'intima, ou tunique intime, est la couche intérieure. Elle est composée d'une assise de cellules endothéliales, reposant sur un tissu conjonctif lâche, le tout formant la membrane

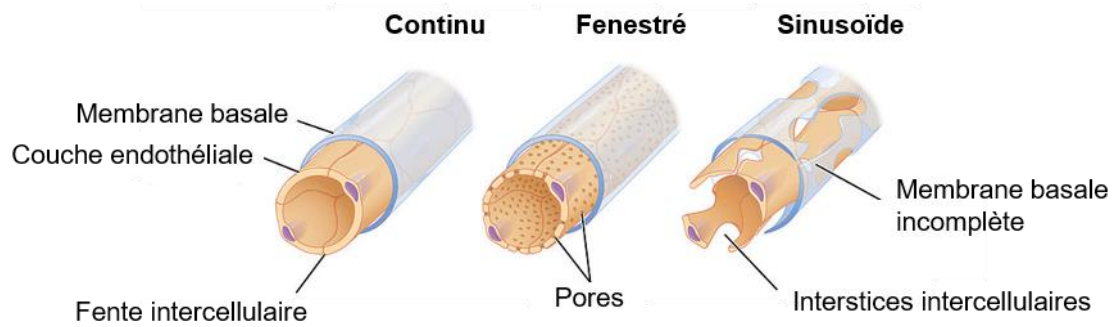


Figure 13. Les différents types de capillaires. Adaptée de (Camargo and Gemperli, 2018).

basale. Cette surface lisse empêche l'agrégation plaquettaire et diminue les forces de frottement du sang contre la paroi, à l'origine de la coagulation.

La média ou tunique moyenne, est la couche intermédiaire de la paroi des vaisseaux. Elle est formée de fibres élastiques ainsi que de deux couches de fibres musculaires lisses : la première avec des fibres organisées de façon longitudinale, la deuxième avec des fibres en spirale. C'est elle qui, en se contractant ou en se dilatant, est responsable de la vasoconstriction ou de la vasodilatation des vaisseaux.

Enfin, l'adventice ou tunique externe, est la couche la plus superficielle. Elle est composée d'un tissu conjonctif riche en collagène, conférant aux vaisseaux leur résistance.

La diminution du diamètre des vaisseaux est due à la disparition de certains éléments de leur structure : la média est de plus en plus fine, avec une seule couche de fibres musculaires.

Au niveau des capillaires, on ne distingue plus qu'une couche de cellules endothéliales, reposant sur une membrane basale. On observe également la présence de péricytes, aussi appelés cellules de Rouget, à la surface des capillaires. Ils ont une fonction contractile, permettant la régulation du flux. Des anneaux de muscle lisse recouvrent les extrémités des capillaires côté artériel : ce sont des sphincters qui permettent d'ouvrir ou de fermer le passage du sang selon le besoin (Camargo and Gemperli, 2018).

On distingue trois types de capillaires, les capillaires continus, les capillaires fenestrés et les capillaires sinusoïdes (**Figure 13**). Les capillaires continus ont une membrane basale continue, et de nombreuses jonctions relient les cellules endothéliales entre elles. Les capillaires fenestrés ont une membrane basale continue, mais des espaces sont présents entre les cellules endothéliales. Ces espaces peuvent être plus ou moins importants selon la contraction des filaments d'actine présents dans le cytoplasme des cellules. On retrouve ce type de capillaire principalement aux abords des annexes cutanées. Enfin, les capillaires sinusoïdes présentent une membrane basale incomplète et de nombreux espaces entre les cellules endothéliales. Ce type de capillaire est très peu présent dans la peau (Camargo and Gemperli 2018).

Les vaisseaux du système veineux présentent une structure et des diamètres relativement similaires à ceux du système artériel, à l'exception de quelques particularités : leur lumière est plus large et leur adventice plus épaisse. En revanche, le tissu conjonctif de leur tunique intime est très fin voire absent, et on ne retrouve plus qu'une seule couche de fibres musculaires dans leur média. Cette différence d'épaisseur entre les vaisseaux du système veineux et ceux du système artériel est due à la différence de pression sanguine. En effet, celle-ci est beaucoup plus élevée dans le système artériel, nécessitant une paroi épaisse et élastique.

Des replis de l'intima vers la lumière peuvent éventuellement être observés, formant des valves et empêchant le reflux du sang. De nombreux péricytes sont également présents à leur surface.

Le volume sanguin cutané est très important : il représente 9% du volume sanguin total au repos, et jusqu'à 12 % en cas de vasodilatation.

Le débit sanguin cutané global quant à lui, varie selon l'activité physique et la température corporelle : de 0,5 L/min au repos, il peut passer à 0,9 L/min en cas d'exercice modéré et aller jusqu'à 7 L/min en cas d'exercice intense et de température élevée (Crickx 2005).

2.2 Le système lymphatique

Le système lymphatique cutané est formé d'un réseau de vaisseaux à sens unique, permettant le retour de la lymphe vers le cœur. Il commence avec des capillaires lymphatiques borgnes, aussi appelés tubules pré-lymphatiques, situés dans les papilles dermiques. Le réseau lymphatique suit ensuite le même trajet que le réseau veineux, pour aboutir aux canaux lymphatiques principaux, qui rejoignent les ganglions lymphatiques et qui débouchent dans les grosses veines à la base du cou, près de l'oreillette droite (Kanitakis, 2002 ; Skobe and Detmar, 2000).

Les vaisseaux du système lymphatique présentent une structure similaire à celle des vaisseaux sanguins, mais leur lumière est plus large, pouvant atteindre jusqu'à 60 µm de diamètre, et plus irrégulière. Les cellules endothéliales qui les composent possèdent un cytoplasme très atténué, formant une paroi très fine, mais également des filaments cytoplasmiques orientés de façon longitudinale, conférant aux vaisseaux une fonction contractile. On ne distingue pas de péricytes à la surface des vaisseaux lymphatiques. Leurs cellules endothéliales possèdent également de nombreux filaments d'ancrage qui permettent une forte adhésion aux fibres de collagène et d'élastine du tissu conjonctif environnant. Ainsi, lorsque la pression interstitielle augmente suite à une augmentation du volume de fluide dans le tissu, les filaments se tendent et entraînent des ouvertures dans la paroi des vaisseaux. Le fluide et les macromolécules peuvent ainsi y pénétrer et former la lymphe (Skobe and Detmar 2000).

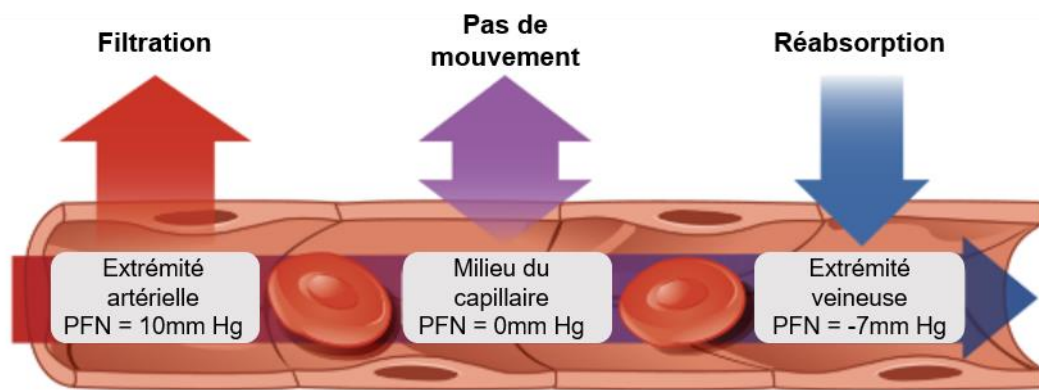
3. Pression et vitesse d'écoulement

La pression sanguine est définie comme la pression exercée par le sang sur la paroi des artères. Elle est exprimée par deux valeurs :

- La pression systolique est la valeur la plus haute (en moyenne 120 mm Hg soit 16 kPa) et correspond à la pression liée à l'éjection du sang lors de la contraction du ventricule.
- La pression diastolique est la valeur la plus faible (en moyenne 80 mm Hg soit 10,6 kPa) et correspond à la pression au moment de la relaxation du ventricule.

Au niveau des vaisseaux, cette pression se traduit par un élargissement au moment de la systole afin d'accueillir le sang, puis une rétractation au moment de la diastole. Les fibres élastiques sont responsables de cette modulation du diamètre des vaisseaux (OpenStax, 2013).

Le débit cardiaque humain, c'est-à-dire la quantité de sang qu'éjecte chaque ventricule en une minute, est en moyenne de 5 L/min au repos. La circulation systémique étant un circuit fermé, le débit est le même à travers toutes les sections cumulées d'un même type de vaisseau.



PFN = Pression de Filtration Nette

Figure 14. Les mécanismes impliqués dans les échanges au niveau des capillaires. Adaptée de <https://opentextbc.ca/anatomyandphysiology/chapter/20-3-capillary-exchange/>.

La relation liant le débit à la vitesse d'écoulement est la suivante :

$$v = \frac{Q}{S}$$

avec :

v la vitesse d'écoulement en m/s

Q le débit en m³/s

S la section en m²

Ainsi, à débit identique, la vitesse d'écoulement est inversement proportionnelle à la surface des sections cumulées de chaque segment du réseau vasculaire. Par exemple l'aorte a une section de 2,5 cm², et une vitesse d'écoulement moyenne du sang de 50 cm/s. En revanche, la section cumulée de l'ensemble des capillaires du corps humain étant de 5000 cm², la vitesse moyenne d'écoulement dans ces derniers est de 0,5 mm/s. Cette faible vitesse d'écoulement dans les capillaires en fait un lieu d'échanges très importants.

4. Les échanges au niveau des capillaires

Comme décrit précédemment, le sang est un liquide complexe constitué de nombreux éléments. Ces différents composants passent des capillaires dans le tissu via différentes voies. Les gaz, les lipides et les molécules liposolubles passent directement à travers la membrane des cellules endothéliales de la paroi des capillaires. Le glucose et les acides aminés utilisent des transporteurs, leur permettant de traverser la membrane par des chemins spécifiques. Le glucose, les ions et les plus grosses molécules peuvent également traverser la paroi via les fentes intercellulaires présentes dans les capillaires continus (**Figure 13**). Les plus gros composants du sang passent des capillaires vers le tissu par les pores des capillaires fenestrés (**Figure 13**), ou par les interstices intercellulaires des capillaires sinusoides (**Figure 13**). La dernière voie d'échange possible est l'endocytose ou l'exocytose par les vésicules (OpenStax, 2013).

Cependant, les mécanismes de diffusion seuls ne permettent pas un transport de masse suffisant depuis et vers les capillaires. Deux types de mécanismes complémentaires sont impliqués dans les échanges moléculaires entre le sang et le tissu : la filtration et la réabsorption (**Figure 14**) (OpenStax 2013 ; Santambrogio 2018).

Le principe de ces deux mécanismes repose sur deux paramètres essentiels : la pression hydrostatique et la pression osmotique.

La pression hydrostatique capillaire est la pression exercée par le sang sur la paroi des capillaires. La pression hydrostatique du tissu étant beaucoup plus faible, le fluide passe du capillaire vers le tissu : c'est le phénomène de filtration. Ce phénomène entraîne une augmentation de la pression hydrostatique du tissu, compensée par l'absorption en continu du fluide interstitiel en excès par les vaisseaux lymphatiques.

La pression osmotique est liée à la différence de concentration des espèces moléculaires entre le sang et le tissu. Les protéines plasmatiques forment une solution colloïdale qui ne peut pas traverser la membrane cellulaire semi-perméable des capillaires. Elles restent donc dans le plasma. Cette concentration en protéines élevée entraîne un flux de l'eau contenue dans le tissu vers l'intérieur du capillaire : c'est la réabsorption.

La pression nette de filtration est définie comme la différence entre la pression hydrostatique et la pression osmotique (**Figure 14**). A l'entrée des capillaires, la pression hydrostatique capillaire est d'environ 35 mm Hg (4,6 kPa) tandis que la pression osmotique capillaire est de 25 mm Hg (3,3 kPa). Ces pressions sont négligeables dans le tissu. La pression nette de filtration est donc de 10 mm Hg (1,3 kPa), et favorise donc le processus de filtration : le fluide s'écoule du capillaire vers le tissu. Au milieu du capillaire, les pressions hydrostatiques et osmotiques du capillaire sont sensiblement égales. La pression nette de filtration est donc nulle, il n'y a pas de transport prédominant du fluide qui diffuse autant dans un sens que dans l'autre. En revanche, à la sortie des capillaires, la perte de volume de fluide dans le capillaire entraîne une diminution de la pression hydrostatique à environ 18 mm Hg (2,4 kPa). La pression nette de filtration est donc de -7 mm Hg (-1 kPa) : le processus de réabsorption est majoritaire et le fluide passe du tissu vers l'intérieur du capillaire. Ces valeurs sont des données moyennes, qui sont dépendantes des individus et variables dans le temps.

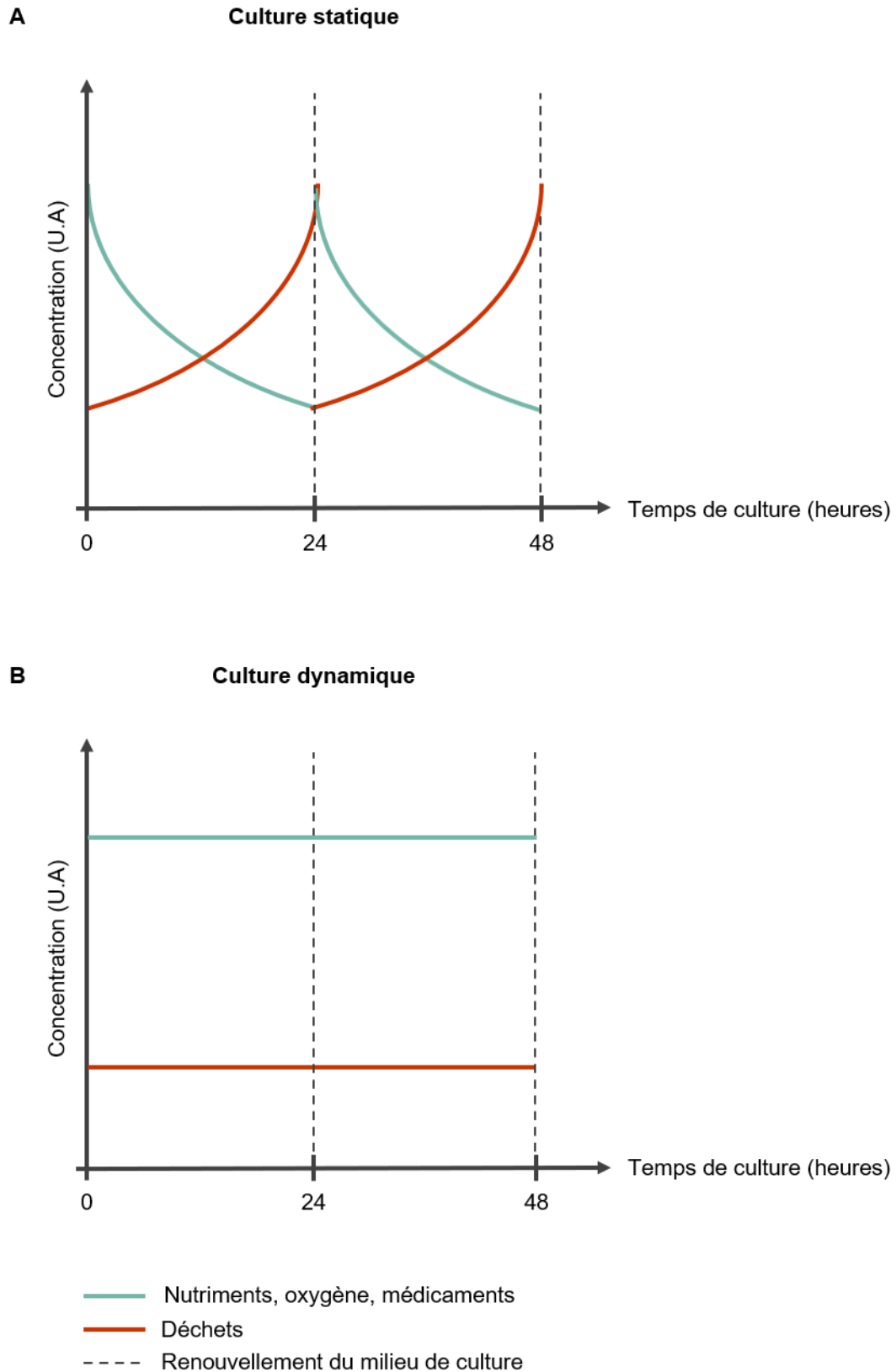


Figure 15. Principe de la culture statique vs la culture dynamique. (A) Principe de la culture statique. (B) Principe de la culture dynamique. Adaptée de (McLean et al., 2018).

Partie 3. Les méthodes existantes pour favoriser les échanges au sein d'un tissu *in vitro*, *in vivo*, *ex vivo* et en clinique

La microcirculation assure, via le sang et la lymphe, certaines fonctions vitales pour l'organisme telles que l'approvisionnement en nutriments et l'oxygénation des tissus, l'élimination des déchets métaboliques, la maintenance de l'équilibre des fluides et de la pression dans le tissu, le bon fonctionnement immunologique ou la thermorégulation du corps. La circulation sanguine permet également le transport des médicaments jusqu'à leur site d'action (**Partie 2, Paragraphe 1**).

Lors de la culture de tissus *ex vivo*, que ce soit des tissus reconstruits utilisés comme modèles d'étude ou destinés à être implantés dans le corps, ou bien des explants, le réseau vasculaire est absent ou non fonctionnel. Les fonctions décrites précédemment ne sont donc plus assurées. Cela pose de nombreuses limites au niveau de la durée de vie des tissus, de leur épaisseur ou bien de leur pertinence pour l'évaluation de l'efficacité ou de la toxicité de molécules administrées en systémique (**Partie 1, Paragraphe 2.5**).

Il y a donc une réelle nécessité de complexifier les méthodes de culture en y intégrant des techniques permettant de favoriser les échanges et le transport de masse, et ainsi reproduire certaines fonctions essentielles de la microcirculation.

Dans un autre contexte, des techniques de perfusion sont également utilisés en clinique afin de remplacer temporairement l'activité cardiopulmaire, dans le cadre de la circulation extra-corporelle (CEC), ou sur des organes isolés en vue de leur transplantation.

1. Les techniques utilisées afin de favoriser les échanges dans les tissus

1.1 La culture dynamique : les tissus sur puces

Traditionnellement, la culture de cellules ou de tissus est réalisée de manière statique : le milieu de culture est renouvelé régulièrement, tous les 1 à 7 jours selon la densité cellulaire ou le type de tissu étudié (Masters and Stacey, 2007 ; McLean et al., 2018).

Depuis l'arrivée de la microfluidique à la fin du 20^e siècle et sa montée en puissance au début du 21^e siècle, de nombreuses équipes de recherche ont tenté d'appliquer les techniques associées à cette discipline à la culture dynamique de cellules ou de tissus (Whitesides, 2006).

Le principe de la culture dynamique repose sur la circulation du milieu de culture dans des micro-canaux, directement au contact du tissu cultivé ou bien séparé des tissus par des membranes poreuses. Cette circulation permet de résoudre un certain nombre de problèmes rencontrés avec la culture statique (McLean et al., 2018).

Tout d'abord, la circulation du milieu de culture permet de favoriser les échanges en oxygène et en nutriments avec le tissu (**Figure 15.B**). Cette circulation permet également d'améliorer l'élimination de déchets cellulaires cytotoxiques qui s'accumulent dans le milieu dans le cas de la culture statique (Halldorsson et al., 2015).

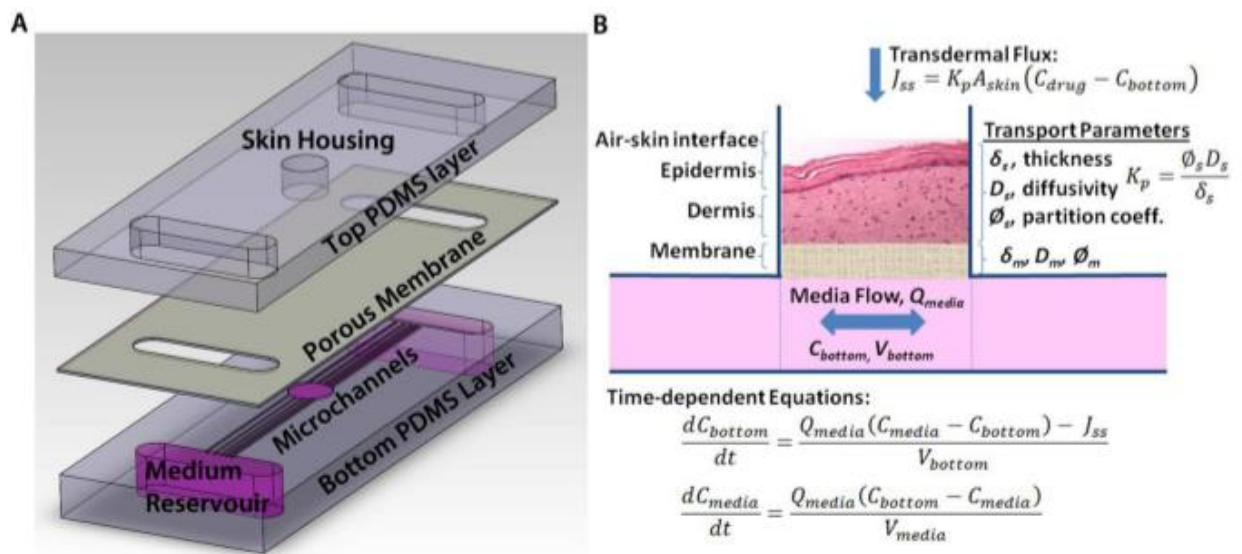


Figure 16. Exemple d'application de la culture dynamique à un modèle de peau reconstruite. (A) Présentation de la puce microfluidique. (B) Principe général du système (Abaci et al., 2015).

Enfin, l'application de la microfluidique à la culture dynamique des tissus permet de définir un environnement contrôlé et caractérisé, ce qui n'est pas le cas dans la culture statique, les concentrations en composés dans le milieu de culture évoluant constamment jusqu'au renouvellement de celui-ci (McLean et al., 2018) (**Figure 15.A**).

La microfluidique permet de contrôler, de façon automatisée et parallélisée, l'approvisionnement en composés temporellement et spatialement, et ainsi étudier localement les réponses d'un tissu à un traitement par exemple (McLean et al., 2018). Le contrôle spatial de l'administration d'un composé peut également permettre la variation des conditions étudiées en différentes zones d'un explant, et ainsi limiter la quantité de tissu nécessaire pour réaliser une expérience (Sung et al., 2011).

La culture dynamique peut être appliquée à de nombreux tissus tels que la peau (Abaci et al., 2015) (**Figure 16**), le foie (Prodanov et al., 2016), l'intestin (Dawson et al., 2016), la rétine (Dodson et al., 2015), des tumeurs (Astolfi et al., 2016), etc. Son intérêt pour améliorer la viabilité cellulaire a été démontré, en comparaison avec la culture statique, notamment lorsque des longs temps de culture sont nécessaires (Ataç et al., 2013 ; Xiao et al., 2017).

Les puces microfluidiques utilisées pour la culture dynamique des tissus sont fabriquées grâce à des techniques traditionnellement utilisées dans l'industrie des microélectroniques, pour la microfabrication de semi-conducteurs, de circuits et de microsystèmes électromécaniques (MEMS). La technique la plus couramment utilisée est la photolithographie, afin de créer des puces en polydiméthylsiloxane (PDMS) (Lazzari, 2019).

1.2 L'implantation et la perfusion d'un dispositif poreux

1.2.1. La microdialyse

La microdialyse est une technique d'échantillonnage *in vivo* peu invasive, permettant la collecte de composés de faibles poids moléculaires dans le fluide extracellulaire, afin d'étudier des phénomènes métaboliques, biochimiques et pharmacologiques dans les tissus vivants (Rea and Kirby, 2019). Elle a été introduite il y a une quarantaine d'années pour l'étude de la concentration en neurotransmetteurs dans le cerveau des rongeurs (Hersini et al., 2014). La microdialyse s'est ensuite développée et a été appliquée à de nombreux tissus tels que le muscle, l'hypoderme ou le derme.

a. Principe

Le principe de la microdialyse (**Figure 17.A**) est basé sur l'implantation dans un tissu d'une sonde, constituée d'une fibre creuse semi-perméable, et perfusée à l'aide d'une pompe avec une solution physiologique, appelée perfusate. Le flux sortant, appelé dialysat, est collecté à différents intervalles de temps et analysé à l'aide de différentes techniques telles que des tests ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) ou de la chromatographie en phase liquide le plus souvent.

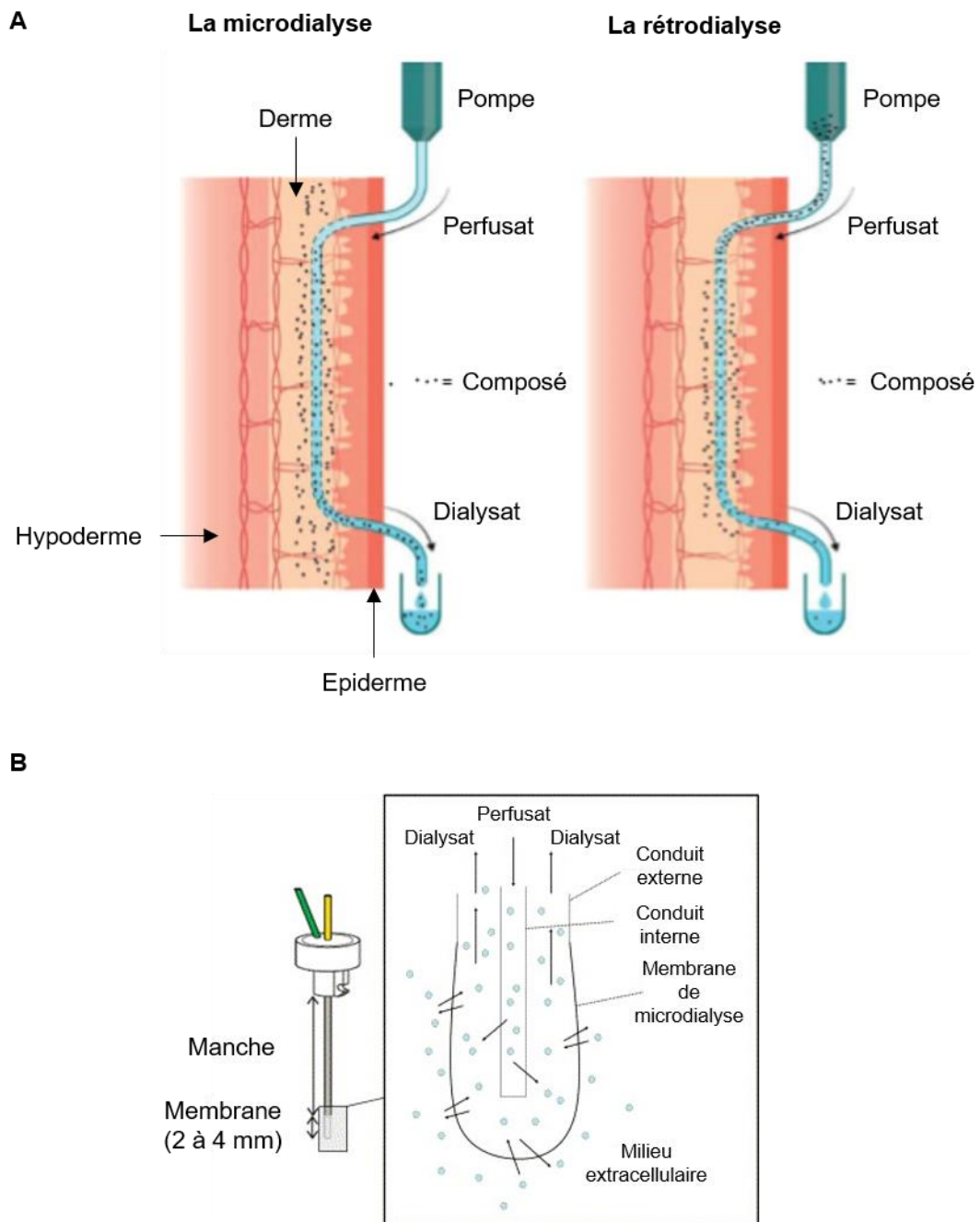


Figure 17. Principe de la microdialyse. (A) Principe de la microdialyse (à gauche) et de la rétrodialyse (à droite) à l'aide d'une sonde linéaire. Adaptée de (Melgaard et al., 2013). **(B)** Présentation de la sonde concentrique. Adaptée de <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0750765806001274>.

b. Les sondes de microdialyse

Deux types de sondes sont utilisées dans le cadre de la microdialyse : les sondes de microdialyse linéaires (**Figure 17.A**), utilisées pour les tissus tels que le derme, l'hypoderme ou le muscle, et les sondes de microdialyse concentriques (**Figure 17.B**), utilisées majoritairement pour les tissus fragiles comme le cerveau, car elles ne nécessitent qu'un seul point d'insertion et sont donc moins invasives.

Les sondes sont constituées d'une membrane poreuse, et de tubulures d'entrée et de sortie.

La membrane, d'une longueur variant de 1 à 10 mm et d'un diamètre externe compris entre 200 et 600 μm , peut être en crurophane, en polyarylethersulphone, en polyethersulfone, en polyuréthane, en polyacrylonitrile ou en cellulose (Hammarlund-Udenaes, 2017). Différentes limites de porosité (*cut-off*) sont disponibles : 6, 15, 20, 30, 35, 55 ou 100 kDa. Le *cut-off* ne représente pas réellement la taille des pores de la membrane, mais correspond à une mesure statistique de l'efficacité de l'échantillonnage par microdialyse pour les molécules d'un certain poids moléculaire. Par exemple, une membrane avec un *cut-off* de 20 kDa empêche le passage d'environ 80 à 90 % des molécules de plus de 20 kDa (Jadhav et al., 2016). Récemment, des membranes avec des *cut-off* supérieurs à 100 kDa et pouvant aller jusqu'à 3000 kDa ont été développées, dans le but d'échantillonner des molécules avec des poids moléculaires plus importants tels que des cytokines ou des protéines thérapeutiques ou des anticorps monoclonaux (Jadhav et al., 2016)

Les tubulures d'entrée et de sortie sont en polyuréthane, en polyéthylène, en téflon, en polyétherétherkétone ou en polyimide.

c. Les échanges à travers la membrane poreuse

La paroi des fibres creuses est perméable aux molécules de faible poids moléculaire et à l'eau. Un transfert de masse a lieu à travers la membrane, par diffusion passive, dépendant du gradient de concentration (Hersini et al., 2014). Les échanges ont donc lieu à la fois du tissu vers le perfusé, et du perfusé vers le tissu. Dans le cas où la microdialyse est utilisée pour administrer des composés dans un tissu, on parle de rétrodialyse (Melgaard et al., 2013) (**Figure 17.A**).

Les échanges au niveau de la membrane poreuse dépendent de plusieurs paramètres (Hersini et al. 2014 ; Hammarlund-Udenaes 2017 ; Rea and Kirby 2019), tels que la surface d'échange conditionnée par la longueur de la membrane poreuse, le *cut-off* de la membrane qui détermine les molécules susceptibles de diffuser en fonction de leur taille, de la viscosité du perfusé ou de la profondeur d'insertion dans le tissu. Le débit joue également un rôle déterminant dans l'efficacité des échanges au niveau de la membrane. La plage de débit traditionnellement utilisée pour de la microdialyse est comprise entre 0,3 et 5 $\mu\text{L}/\text{min}$. Le choix du débit dépend de l'application. Dans le cas du dosage du lactate, du pyruvate ou du glucose par exemple, le débit utilisé est très faible, afin de garantir que la concentration du dialysat est la plus proche possible de celle du fluide interstitiel. En revanche, dans les cas où l'application nécessite des échantillonnages très réguliers, le débit utilisé est plus élevé, impliquant alors un plus faible pourcentage de récupération.

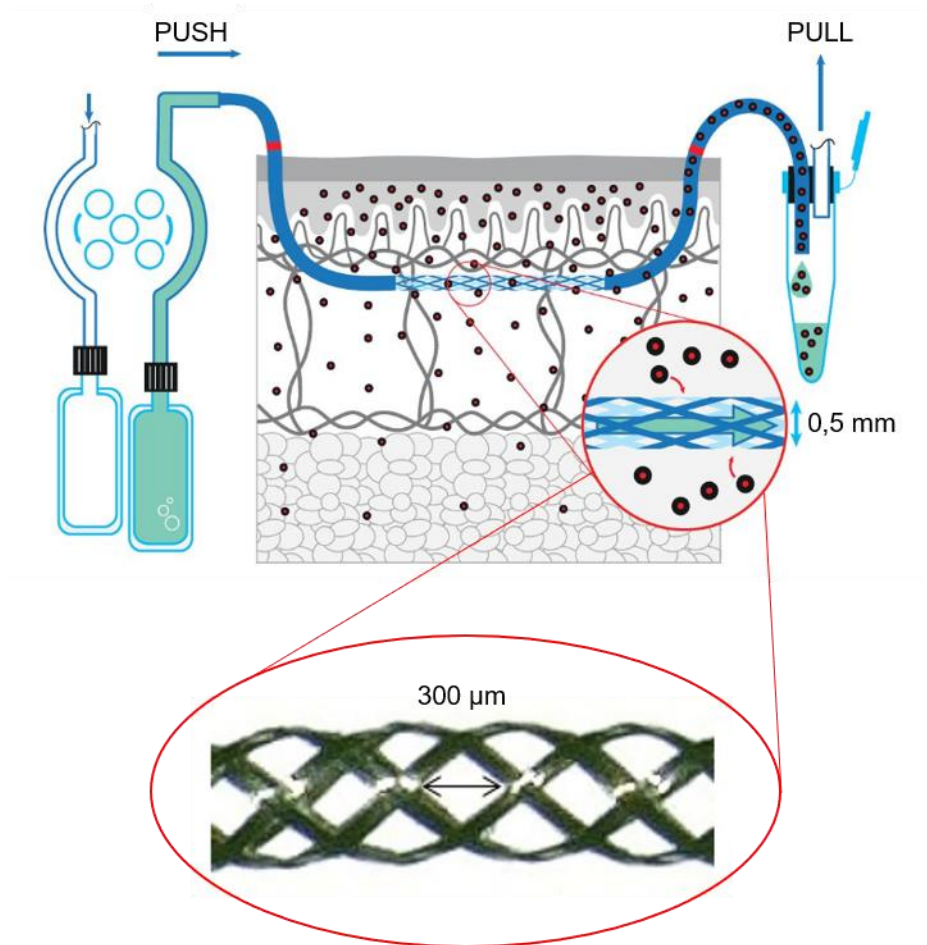


Figure 18. Principe de la microperfusion en libre circulation. Adaptée de <https://www.joanneum.at/en/health/productssolutions/pharmacokinetics-pharmacodynamics-bioequivalence/pkpd-in-skin/>.

Enfin, le matériau de la fibre creuse peut également avoir un impact sur l'efficacité des échanges. En effet, certains matériaux peuvent adsorber les composés hydrophobes et minimiser la concentration mesurée (Hammarlund-Udenaes, 2017).

d. Application de la rétro dialyse à l'administration d'un médicament dans un explant de peau humaine

En 2019, une équipe de recherche composée de scientifiques issus du laboratoire pharmaceutique GSK (Angleterre) et de la CRO RefLab (Danemark), ont utilisé le principe de la rétro dialyse pour administrer un composé dans un explant de peau humaine (Ramirez Molina et al., 2019). L'objectif de leur étude est d'analyser le potentiel effet d'un composé sur l'inhibition de la sécrétion d'histamine par les mastocytes présents dans la peau, responsable entre autres de l'urticaire chronique spontanée. Pour ce faire, la sécrétion d'histamine dans la peau a été induite par injection intradermique d'anti-IgE. Le composé à étudier a été administré dans la peau par rétro dialyse, et la concentration en histamine du fluide interstitiel a été mesurée par micro dialyse.

Neuf sondes de micro dialyse linéaires EP Low Flux (EP Medicam) constituées d'une membrane poreuse de 10 mm de longueur avec une limite de porosité de 2 kDa ont été implantées à environ 0,7 mm de profondeur dans le derme d'un échantillon de 3 cm par 10 cm de peau humaine *ex vivo*. Ces sondes ont un diamètre externe de 208 μm . La perfusion a été réalisée pendant 4 heures à un débit de 3 $\mu\text{L}/\text{min}$.

Les résultats ont démontré une inhibition de la sécrétion d'histamine par les mastocytes, induite par le composé étudié.

Des problèmes techniques ont tout de même été observés pour certains répliquats, dont l'obturation des sondes de micro dialyse, rendant alors leur analyse impossible.

1.2.2. La microperfusion en libre circulation

Une nouvelle technique d'échantillonnage *in vivo* a récemment été développée par l'institut de recherche Joanneum Research Health (Autriche), inspirée de la micro dialyse. Cette technique appelée microperfusion en libre circulation (open-flow microperfusion), a pour objectif l'étude de la pharmacocinétique et de la pharmacodynamique de médicaments, principalement des grosses molécules ou des substances lipophiles. Elle consiste à collecter de petits volumes de fluide interstitiel dans le cerveau, le derme ou l'hypoderme, puis à les analyser.

La différence avec la micro dialyse réside dans la partie poreuse de la sonde utilisée. Dans le cas de la microperfusion, la sonde ne comporte pas de membrane, mais des pores de l'ordre de 300 μm de diamètre (**Figure 18**). Il n'y a donc aucun phénomène de filtration du fluide interstitiel. La zone poreuse est longue de 15 mm et le diamètre externe de la sonde est de 500 μm .

Les sondes sont perfusées à des débits allant de 0,1 à 10 $\mu\text{L}/\text{min}$, à l'aide d'un système push-pull : une pompe est placée à l'entrée de la sonde et injecte le perfusé, tandis qu'une autre pompe est placée en sortie de la sonde et aspire le dialysat. Les expériences sont menées sur des temps allant jusqu'à 48 heures au maximum.

La microperfusion en libre circulation a été validée *in vivo* pour la collecte de différentes molécules, telles que des anticorps monoclonaux comme le Secukinumab (Dragatin et al., 2016), des cytokines pro-inflammatoires (Kolbinger et al., 2017) ou bien des substances lipophiles (Holmgaard et al. 2012 ; Bodenlenz et al. 2017).

Aucune application de ce type de perfusion à des modèles *in vitro* n'a à ce jour été décrite dans la littérature

1.3 La vascularisation des tissus reconstruits

Une fois implantés dans le corps, les tissus reconstruits sont généralement revascularisés spontanément. Cette angiogenèse est due d'une part au processus de cicatrisation engendré par l'opération chirurgicale, et d'autre part à la sécrétion de facteurs de croissance angiogéniques induite par l'état hypoxique de l'implant (Rouwkema et al., 2008). Cependant, ce processus d'angiogenèse est très lent, ce qui ne permet pas la survie des tissus épais. Le problème d'approvisionnement insuffisant en nutriments et en oxygène se pose également lors de la culture *in vitro* des tissus reconstruits avant leur implantation. Il y a donc une réelle nécessité de promouvoir la vascularisation des tissus reconstruits, afin de surpasser les limites de taille imposées par les contraintes actuelles (Auger et al., 2013).

Les différentes techniques de vascularisation utilisées en ingénierie tissulaire peuvent être divisées en deux catégories : les techniques basées sur la pré-vascularisation des tissus, et les techniques basées sur la vasculogenèse et l'angiogenèse (Frueh et al., 2017 ; Hasan et al., 2014 ; Lovett et al., 2009 ; Novosel et al., 2011).

1.3.1. Les techniques basées sur la pré-vascularisation des tissus

La pré-vascularisation des tissus consiste à créer un ou plusieurs micro-canaux perfusables dans le tissu, dans le(s)quel(s) des cellules endothéliales sontensemencées, afin de mimer un vaisseau sanguin ou un réseau vasculaire (Hasan et al., 2014). Cette technique permet la perfusion du tissu dès le début de la culture et de façon continue jusqu'à son implantation, améliorant ainsi la prolifération et la croissance cellulaire. Différentes méthodes existent afin de créer ces micro-canaux et peuvent être divisées en trois groupes : les méthodes dites soustractives, les méthodes additives et les méthodes hybride avec la bioimpression.

a. *La création de micro-canaux par soustraction*

La création de micro-canaux par soustraction consiste à éliminer un matériau sacrificiel présent dans un hydrogel. Deux méthodes peuvent être utilisées.

La première, relativement simple à exécuter, ne permet la formation que de structures basiques et ne permet donc pas la vascularisation de tissus de grande taille. Elle consiste à insérer une aiguille ou tout autre objet cylindrique dans l'hydrogel liquide. Une fois solidifié, l'aiguille peut être retirée, laissant ainsi son empreinte (**Figure 19**) (Mori et al., 2017).

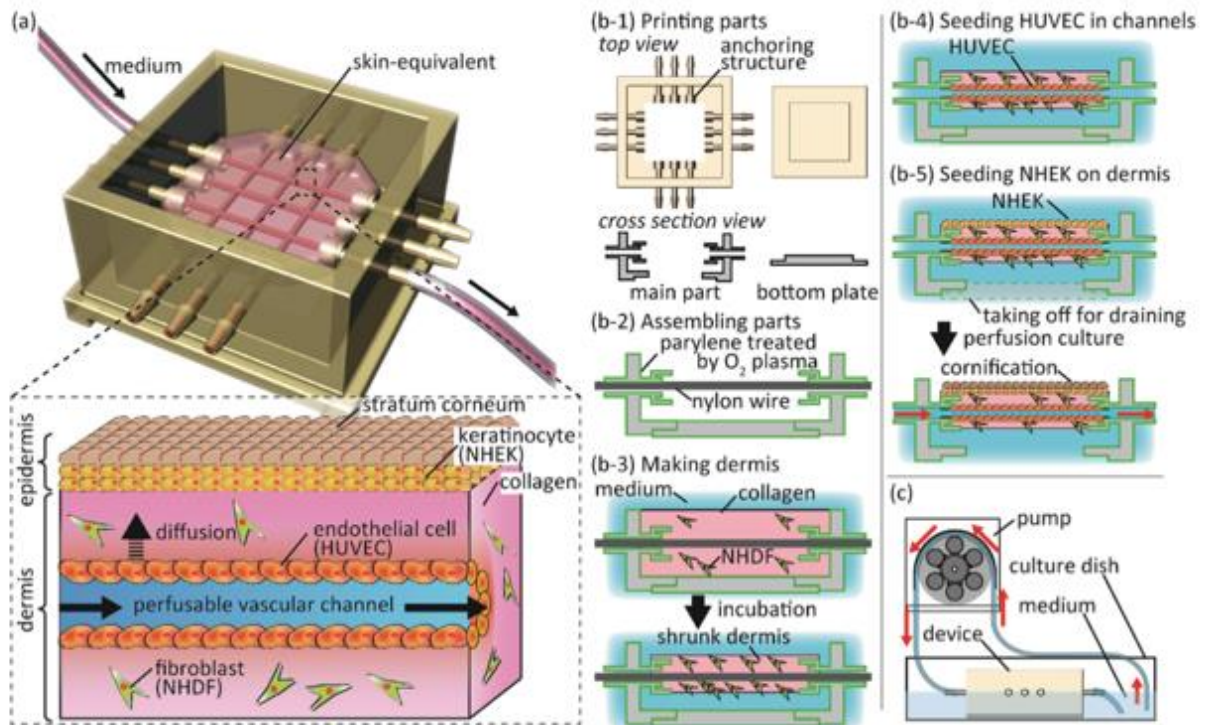


Figure 19. Exemple de pré-vascularisation d'un modèle de peau reconstruite grâce à la création de microcanaux par soustraction. (a) Le modèle de peau reconstruite et son dispositif de culture. (b) Fabrication du dispositif de culture et production de la peau reconstruite. (c) Système de perfusion (Mori et al., 2017).

La seconde technique consiste à créer un moule négatif reprenant la structure des vaisseaux souhaités, dans un matériau sacrificiel, en impression 3D ou en micromoulage par exemple. Un hydrogel est ensuite coulé autour de ce moule. Après réticulation de l'hydrogel, le matériau sacrificiel est dissout ou fondu, et éliminé par perfusion des canaux ainsi créés.

b. La création de micro-canaux par addition

La création de microcanaux par addition consiste à créer un réseau de canaux en 3D par superposition et liaison de différentes couches d'hydrogel, préformées en utilisant des techniques de microfabrication comme la photolithographie et le micromoulage par exemple (Hasan et al., 2014). La liaison entre les différentes couches d'hydrogel est réalisée par fonte partielle, ou en utilisant un plasma pour fonctionnaliser les deux surfaces.

c. La bioimpression

La bioimpression consiste à imprimer des cellules vivantes dans un espace en 3D, afin de reconstruire des structures biologiques par dépôt couche par couche de matricesensemencées avec des cellules (Hasan et al., 2014). Cette technique utilise des principes additifs, et la soustraction de matériaux sacrificiels, d'où sa classification en tant que méthode hybride. De nombreuses équipes de recherches travaillent sur la reconstruction de structures vasculaires en 3D grâce à la bioimpression (Hasan et al., 2014).

1.3.2. Les techniques basées sur l'angiogenèse et la vasculogenèse

Les techniques basées sur l'angiogenèse et la vasculogenèse consistent à promouvoir la formation de réseaux vasculaires en 3D dans des tissus reconstruits, en recréant un microenvironnement biomimétique, favorisant ces phénomènes (Hasan et al., 2014). Trois techniques peuvent être utilisées : la fonctionnalisation de biomatériaux, l'utilisation de gradients de facteurs de croissance et la coculture de différents types cellulaires.

a. La fonctionnalisation de biomatériaux

Afin de promouvoir la formation de vaisseaux, les supports de culture (scaffolds) utilisés dans l'ingénierie tissulaire peuvent être fonctionnalisés. Pour ce faire, des facteurs de croissance angiogéniques, des protéines de la matrice extracellulaire, des peptides ou autres biomolécules sont couplés par liaisons covalentes avec les scaffolds (Hasan et al., 2014). Cette fonctionnalisation permet entre autres la migration, la pénétration et l'organisation des cellules (Lee and Mooney, 2001).

b. L'utilisation de gradients de facteurs de croissance

La mise en place d'un gradient de concentration de facteurs de croissance à proximité de cellules endothéliales, que ce soit au sein d'un hydrogelensemencé ou à travers des canaux microfluidiques, provoque la migration des cellules des régions à faible concentration vers les régions à forte concentration en facteur de croissance. Ainsi, les cellules peuvent être alignées en structures organisées, mimant la structure tubulaire des capillaires (Hasan et al., 2014).

c. *La coculture de différents types cellulaires*

La coculture de différents types cellulaires dans un microenvironnement adapté peut induire l'alignement spontané des cellules endothéliales, et ainsi générer un réseau vasculaire (Hasan et al., 2014). Différents types de cellules peuvent être utilisées, telles que les fibroblastes, les hépatocytes, les cellules des muscles lisses ainsi que différentes cellules souches. Différentes hypothèses ont été émises afin de justifier cet alignement lors de coculture de cellules. Dans le cas des fibroblastes, cela pourrait être dû aux interactions entre les cellules et la matrice extracellulaire produite en grande quantité par ces derniers (Tremblay et al., 2005). Les hépatocytes quant à eux, sécrètent de nombreux facteurs de croissance qui pourraient stimuler la mobilité des cellules endothéliales.

2. Les techniques de perfusion utilisées en clinique

Le terme perfusion peut avoir deux significations : il désigne d'une part une technique médicale consistant à administrer un composé par voie parentérale, c'est-à-dire sans passer par la voie intestinale, et d'autre part un processus physiologique - la perfusion tissulaire - durant lequel un organe est alimenté en nutriments et en oxygène par le biais du sang ou de la lymphe. Ce processus peut être reproduit *ex vivo* grâce à une perfusion artificielle.

2.1 L'administration de composés par perfusion

2.1.1. Principe et voies d'administration

Comme décrit précédemment, la perfusion est une technique médicale qui consiste à injecter de façon lente et/ou continue une solution dans l'organisme par voie parentérale. Les principales solutions perfusées sont des médicaments, du sang (on parle alors de transfusion) ou des solutés de nutrition et d'hydratation.

Leur administration peut se faire par différentes voies. La plus courante est la voie intra-veineuse, via une veine superficielle (dans le bras généralement) ou une veine profonde (veine cave, jugulaire ou fémorale) (Peterfreund and Philip 2013 ; Kim et al. 2017). La perfusion peut également se faire par voie sous-cutanée, on parle alors d'hypodermoclyse, et est utilisée majoritairement pour l'administration de solutés d'hydratation ou de nutrition lorsque l'accès aux veines est difficile, chez des personnes âgées par exemple (Caccialanza et al. 2016). Enfin, elle peut être réalisée dans la moelle osseuse, richement vascularisée et qui a l'avantage de ne pas s'affaisser (LaRocco and Wang, 2003). Ce type de perfusion est réalisé en urgence lorsque la voie intra-veineuse est impossible.

2.1.2. Les cathéters

La perfusion se fait grâce à l'implantation d'un cathéter dans la zone d'intérêt.

Le cathéter est un tube fin et souple produit dans un matériau biocompatible : un silicone, du polyuréthane ou du polytétrafluoréthylène. Son intérêt est qu'il peut rester implanté dans l'organisme sur des temps longs, permettant ainsi des injections prolongées ou répétées, sans avoir à repiquer à chaque fois. Il peut également servir à drainer un excès de liquide dans le corps.

La longueur et le diamètre des cathéters varient selon leur utilisation. Le diamètre externe est exprimé en Gauge (G) : plus il est élevé et plus la gauge diminue.

Le cathéter est généralement relié à une tubulure en polychlorure de vinyle ou en polyuréthane, puis à un système de perfusion.

2.1.3. Les systèmes de perfusion

Le système de perfusion comprend un mécanisme de propulsion ainsi qu'un système de régulation du débit.

Dans une veine, la pression dépend de la résistance des vaisseaux, de la contraction du cœur et de la gravité. Au niveau d'une veine périphérique, la pression est de l'ordre de 20 à 40 mmHg (2,7 à 5,3 kPa) en position debout, et entre 5 et 25 mmHg (0,7 et 3,3 kPa) en position allongée. Au niveau d'une veine centrale, elle est de l'ordre de 5 mmHg (0,7 kPa) (Mazumdar, 2015). Lors d'une perfusion, la pression exercée par le système doit alors être supérieure à la pression veineuse afin de propulser le fluide dans l'organisme.

Pour cela, il existe différentes méthodes : la perfusion par gravité, les diffuseurs ou l'énergie mécanique avec l'usage d'une pompe.

a. La perfusion par gravité

Le principe de la perfusion par gravité repose sur l'utilisation de la pression hydrostatique générée par la différence de hauteur entre le niveau du soluté présent dans la poche de perfusion et le cathéter. Le débit de la perfusion est alors défini par la loi de Poiseuille (Mazumdar, 2015), appliquée ici à un cathéter de section circulaire :

$$Q = \frac{\pi \cdot r^4 \cdot dP}{8 \cdot \mu \cdot L}$$

avec :

Q le débit de la perfusion

r le rayon de la tubulure/du cathéter

dP la différence de pression

μ la viscosité du fluide

L la longueur de la tubulure

La différence de pression dP imposée est quant à elle déterminée par la différence de hauteur dH entre la surface libre du liquide dans la poche de perfusion (P_{atm}) et le cathéter (P_c). Le théorème fondamental de l'hydrostatique nous permet d'exprimer : $dP = P_c - P_{atm}$ sous la forme $dp = \rho \cdot g \cdot H$.

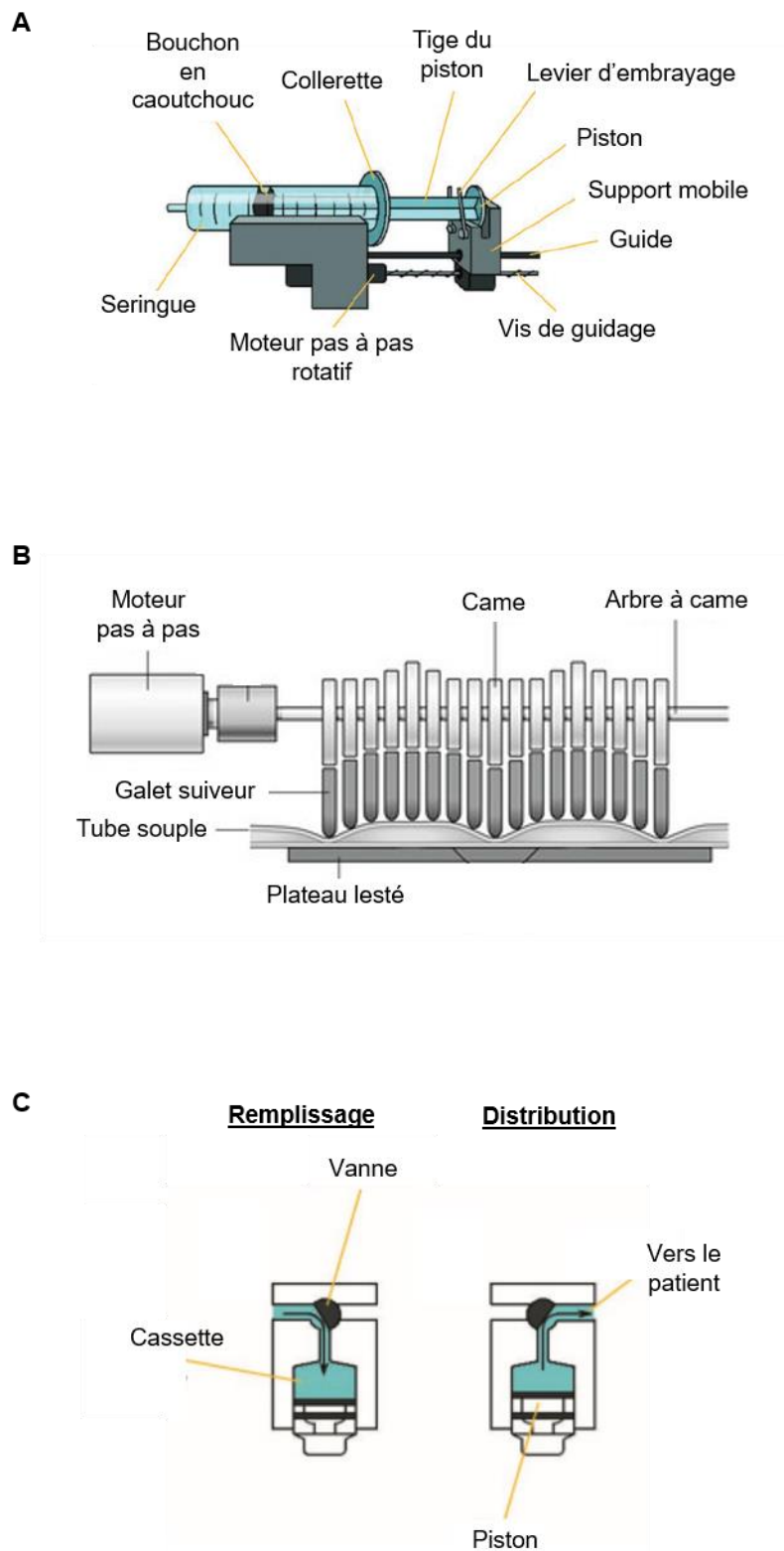


Figure 20. Les différents types de pompes utilisés pour l'administration de composés par perfusion. (A) Le pousse-seringue. Adaptée de (Kim et al., 2017). (B) La pompe péristaltique linéaire. Adaptée de <https://clinicalgate.com/infusion-equipment-and-intravenous-anaesthesia/>. (C) La pompe à cassette. Adaptée de (Kim et al., 2017).

En pratique, le débit réel est contrôlé grâce à un système de chambre compte-goutte : la solution à perfuser s'écoule dans un réservoir sous forme de gouttes dont on connaît le volume. Le nombre de gouttes qui s'écoule en une minute permet de déterminer le débit de la perfusion. Il existe différents systèmes, les plus répandus étant les systèmes 15 gouttes/min ou 60 gouttes/min.

Le débit peut être contrôlé grâce à une pince à roulettes qui va permettre le fluage de la tubulure : l'écrasement progressif de cette dernière permet de réduire le débit.

La perfusion par gravité est très répandue pour l'administration de gros volumes de solutions, ne nécessitant pas de débits très précis. Son principal avantage est qu'elle est facile à mettre en place et peu onéreuse. De plus, la pression étant limitée par la différence de niveau entre le patient et la poche de perfusion, il y a peu de risques d'infiltration et de dommages au niveau des tissus sous-cutanés. En revanche, les erreurs humaines potentielles sont nombreuses lors de la mise en place de ce type de perfusion, et le risque d'injection d'air dans l'organisme est également élevé, pouvant entraîner une embolie gazeuse. Il est également difficile d'obtenir un débit précis et contrôlé, d'une part car le volume d'une goutte peut varier selon la composition du fluide, et d'autre part car le débit est amené à changer au cours de la perfusion en cas de variation de la pression veineuse ou de mouvements du patient, nécessitant donc une surveillance régulière (Peterfreund and Philip 2013 ; Kim et al. 2017).

b. Le diffuseur portable

Le diffuseur portable est un système de perfusion non programmable et fonctionnant sans apport d'énergie, permettant le traitement des patients à domicile. Le diffuseur est constitué d'une membrane élastomère sous forme d'un ballon, dans lequel est injectée la solution à perfuser. Une fois injectée dans le ballon, la solution est perfusée par une surpression induite par la membrane élastomère. Le débit est préréglé et dépendant du type de modèle (Kim et al., 2017).

c. Les pompes

L'utilisation d'une force motrice extérieure peut s'avérer nécessaire lors de l'administration de produits plus visqueux, lorsque la pression veineuse est très élevée, ou pour travailler à des débits très précis et contrôlés. Cependant, le risque d'extravasation est plus important qu'avec les autres systèmes de perfusion (Kim et al., 2017).

On distingue trois types de pompes utilisées dans le cadre d'une perfusion : le pousse-seringue, la pompe péristaltique linéaire et la pompe à cassette (**Figure 20**).

Le pousse-seringue (**Figure 20.A**) est un équipement permettant d'administrer de façon lente et très précise de faibles volumes de solution (inférieurs à 60 mL typiquement). Une seringue en verre ou en plastique contenant la solution à perfuser est maintenue dans un berceau. Le piston de la seringue est maintenu par une pince qui va être actionnée grâce à un moteur, permettant de tirer ou de pousser le piston. Le débit de la perfusion est fonction du diamètre de la seringue et de la vitesse du piston et peut être contrôlé jusqu'à des valeurs de l'ordre de 0,01 nL/min.

La pompe péristaltique linéaire ou pompe à doigts (**Figure 20.B**) permet l'injection de grands volumes (supérieurs à 60 mL) à des débits constants et contrôlés dans le temps. Cependant, un effet pulsatile peut être observé à de faibles débits. La solution à perfuser est contenue dans un tube souple qui est comprimé et décomprimé de façon alternée par l'action des doigts de la pompe, entraînant le déplacement du liquide qui est incompressible. Le débit de la perfusion est fonction du diamètre du tube souple et de la vitesse de mouvement des doigts de la pompe.

Enfin, la pompe à cassette ou pompe volumétrique (**Figure 20.C**) permet également l'injection de grands volumes (supérieurs à 60 mL) grâce à un système de piston et de vanne. La solution à perfuser est contenue dans une cassette qui est remplie ou vidée par l'action d'un piston. La vanne s'ouvre ou se ferme selon qu'il faille remplir ou vider la cassette. Dans ce type de pompe, le débit est fonction de la vitesse linéaire du piston. L'inconvénient de ce type de pompe est l'arrêt du flux lors du re-remplissage de la cassette par le piston. Les pompes à cassettes sont de moins en moins utilisées en clinique (Peterfreund and Philip 2013 ; Kim et al. 2017).

2.2 La perfusion d'organes *ex vivo*

La perfusion d'organes est aujourd'hui utilisée en clinique principalement dans le cadre de la circulation extra-corporelle (CEC) afin de remplacer temporairement l'activité cardiopulmonaire durant les chirurgies cardiaques, et sur des organes isolés en vue d'une transplantation.

2.2.1. Principe

Le principe de la perfusion d'organes est de générer un flux artificiel à travers le réseau vasculaire de l'organe, afin de lui apporter l'oxygène et les nutriments nécessaires, d'éliminer les déchets métaboliques, et de maintenir la tonicité des vaisseaux.

a. *Historique*

De nombreuses années de recherche et la contribution de nombreux scientifiques ont été nécessaires afin de développer les techniques actuelles. Le physiologiste français Jean-Jacques Le Gallois a introduit le premier le principe de perfusion *ex vivo* en 1812, en faisant le postulat suivant : “ *But if the place of heart could be supplied by injection – and if, for the regular continuance of this injection, there could be furnished a quantity of arterial blood, whether natural, or artificially formed, supposing such a formation possible – then life might be indefinitely maintained in any portion (...)* ” (Boettcher et al. 2003). La première opération à cœur ouvert réussie utilisant un système cœur-poumon artificiel a été réalisée par John Heyshman Gibbon en 1953 sur une jeune fille de 18 ans. Il avait déjà effectué avec succès une opération avec bypass cardiopulmonaire sur un animal en 1937. C'est à partir des années 1960 et avec l'apparition des greffes d'organes que les machines de préservation ont vu le jour, marquées par la première transplantation chez l'Homme d'un rein perfusé pendant 17 heures. Cependant, les machines de perfusion pour la transplantation ont cessé de se développer avec la découverte des solutions de préservation et la mise en place du stockage statique à froid, plus simple à mettre en place et permettant d'obtenir de très bons résultats (Callaghan 1986 ; Boettcher et al. 2003 ; Jing et al. 2018), avant de refaire surface il y a quelques années.

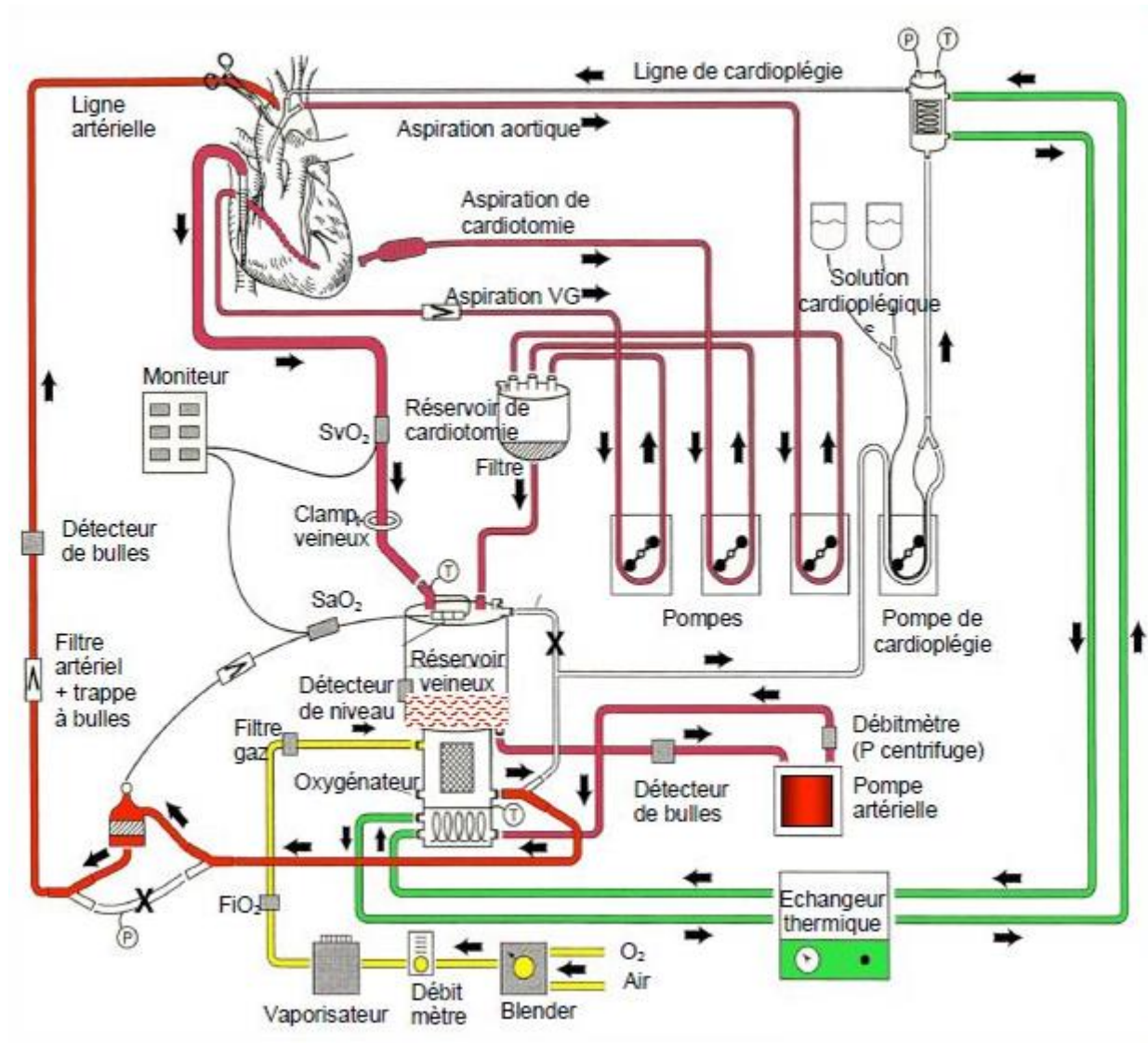


Figure 21. La circulation extracorporelle. En rouge : le circuit sanguin. En vert : le circuit de l'eau. En jaune : le circuit des gaz frais. Adaptée de <https://www.pac5.ch/fr/node/155/take>.

d. La circulation extra-corporelle

La circulation extra-corporelle (**Figure 21**) est utilisée en chirurgie cardiaque afin de pouvoir arrêter temporairement les poumons et vider le cœur de son sang, tout en continuant à assurer les fonctions vitales de ces deux organes. Les trois fonctions principales des appareils de CEC sont de :

- Maintenir la circulation systémique ou grande circulation, c'est-à-dire l'approvisionnement en sang artériel oxygéné aux organes du corps, puis le renvoi du sang veineux pauvre en oxygène et riche en dioxyde de carbone en direction du cœur,
- Remplacer les poumons dans la circulation pulmonaire ou petite circulation, en assurant la réoxygénation du sang veineux, et l'élimination du dioxyde de carbone,
- Réguler la température du sang.

En pratique, le sang veineux pauvre en oxygène est récupéré dans le cœur au niveau de l'oreillette droite grâce à l'introduction d'une ou deux canules. Le sang est drainé naturellement par gravité, jusqu'au réservoir veineux, induite par une différence de hauteur entre le patient et le réservoir allant de 30 à 70 cm (Chassot et al., 2010).

La pompe principale, placée juste après le réservoir veineux, permet de transporter le sang du réservoir jusqu'à l'oxygénateur. Cet oxygénateur a pour rôle de réoxygéner le sang, d'éliminer le dioxyde de carbone dissout mais également d'y introduire un gaz anesthésiant.

Le sang passe ensuite dans un filtre et un piège à bulles, placés juste avant le retour au système artériel, afin d'éliminer toutes les particules qui pourraient être responsables d'embolies, mais également les bulles qui pourraient être la cause d'embolies gazeuses. En effet, les sources possibles d'embolie gazeuse sont nombreuses dans un système de CEC : l'oxygénateur, le réservoir veineux, mais également les variations de température du sang (les gaz dissouts passent en phase gazeuse lorsque la température augmente), et les phénomènes de cavitation : lorsque la pression locale diminue, des microbulles se créent) (Chassot et al., 2010).

Le retour du sang dans le circuit artériel se fait au niveau de l'aorte descendante ou via une artère plus distale comme l'artère fémorale en haut de la cuisse ou la sous-clavière droite. La pompe principale permet le retour sanguin à un débit physiologique de l'ordre de 2,4 L/min/m² de surface corporelle, et à une pression artérielle normale comprise entre 60 et 90 mmHg (Chassot et al., 2010).

In vivo, la pression sanguine est pulsatile : elle est à son maximum lors de la systole, et diminue lors de la diastole. Cette pulsatilité améliore la circulation et la perfusion tissulaire, et diminue le risque de thrombose. Cependant, cette pulsatilité artérielle n'est pas reproduite dans les systèmes de CEC. En effet, sa complexité technique, le coût de sa mise en place et les risques d'hémolyse qu'elle engendre rendent son apport global peu significatif par rapport à l'investissement représenté (Chassot et al., 2010). De plus, il a été démontré que cette pulsatilité n'était que facultative lorsque le patient est sous anti-coagulants (Slaughter et al., 2009).

Deux pompes d'aspiration supplémentaires permettent de récupérer le sang dans le ventricule gauche et dans le champ opératoire afin de le réinjecter dans le réservoir veineux, et ainsi réduire le besoin en transfusion sanguine. Ce sang est centrifugé à l'aide d'un dispositif CellSaver™, afin de séparer les globules rouges du plasma, des plaquettes et des débris cellulaires.

Enfin, une quatrième pompe permet d'injecter dans le cœur une solution de cardioplégie qui permet de l'arrêter, de le protéger et de lui fournir tous les éléments nécessaires à sa survie jusqu'à la reprise de son activité.

e. La perfusion d'organes avant leur transplantation

La greffe est la meilleure thérapie lorsque les patients atteignent un stade terminal d'insuffisance organique. De nombreux organes peuvent être transplantés : les poumons, le cœur, le foie, les reins mais aussi le pancréas ou les intestins. Les avancées techniques réalisées au cours des dernières décennies ont fait de cette pratique une opération courante et à succès, permettant d'améliorer considérablement la qualité de vie des patients.

Cependant, la limite principale de cette pratique est la pénurie de greffons. En effet, des critères très stricts se doivent d'être respectés concernant les donneurs éligibles et les organes transplantables. Par exemple, les poumons de donneurs en mort cérébrale sont très souvent endommagés du fait du relargage de cytokines engendré par un dommage au cerveau, des conséquences de la ventilation sur la qualité des greffons, des infections ou bien des temps prolongés d'ischémie à chaud (Munshi et al. 2013 ; Cypel et al. 2019). De ce fait, les poumons de seuls 15 à 20 % des donneurs d'organes sont éligibles pour une transplantation (Van Raemdonck et al. 2009 ; Snell and Westall 2011). C'est pourquoi on voit depuis quelques années l'émergence des prélèvements sur des donneurs dits « marginaux » ou « à critères élargis », c'est-à-dire qu'ils n'auraient pas été éligibles jusqu'alors du fait de leur âge, de leurs pathologies ou bien car ils sont décédés par arrêt circulatoire (Jing et al., 2018).

Depuis la découverte des solutions de préservation dans les années 1960, la technique de stockage à froid est la plus communément utilisée. Une fois prélevé du donneur, le greffon est rincé avec une solution de préservation à une température comprise entre 0 et 4°C, puis il est immergé dans cette même solution jusqu'à sa transplantation. Cette température de stockage permet le ralentissement du métabolisme cellulaire et donc des besoins en nutriments et en oxygène (Jing et al., 2018). Cependant, elle arrive aujourd'hui à ses limites en raison des dommages aux tissus engendrés par une hypothermie prolongée et par la reperfusion suite à des temps longs d'ischémie. De plus, elle ne permet pas le reconditionnement des greffons, ce qui est devenu un réel besoin avec l'émergence des organes marginaux, afin de pouvoir évaluer la viabilité et la fonctionnalité des organes en dehors du corps des donneurs sans fausser le diagnostic (Pirenne, 2010).

Afin de pallier ces problèmes, les machines de perfusion développées dans les années 1950 ont refait leur apparition et ont été améliorées. Leur principe consiste à faire circuler une solution de préservation dans le réseau vasculaire du greffon à l'aide d'une pompe, de façon pulsatile ou non.

La température du perfusé peut être régulée selon l'application et l'activité métabolique souhaitées : elle varie entre 35 et 38°C dans le cas des machines normothermiques, entre 20 et 34°C dans le cas des machines subnormothermiques et entre 0 et 8°C pour les machines hypothermiques (Jing et al., 2018).

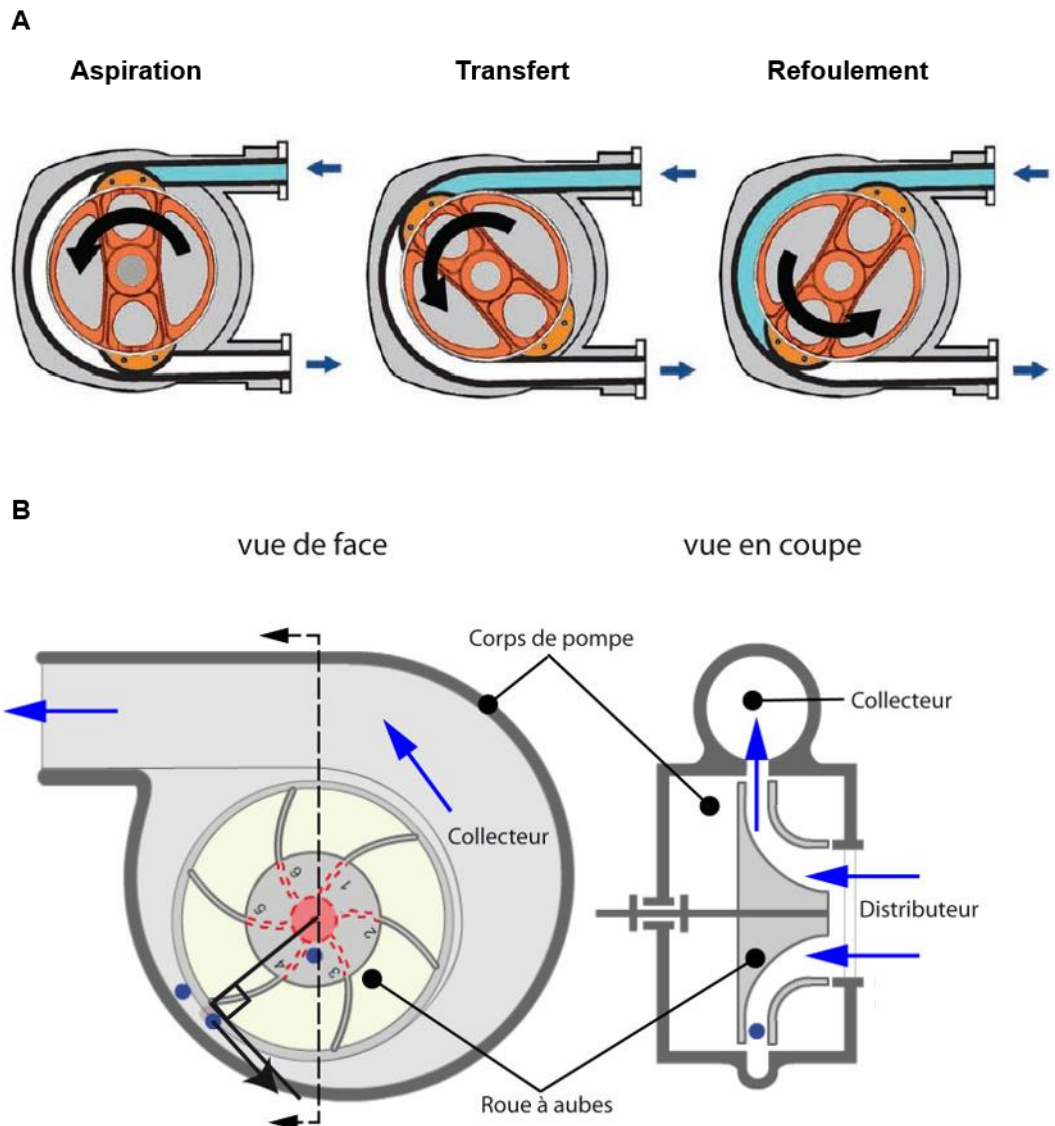


Figure 22. Les différents types de pompes utilisés pour la perfusion d'organes *ex vivo*. (A) La pompe à galets. Adaptée de <https://www.tech-pompes.fr/pompes-volumetriques/pompes-peristaltique/>. (B) La pompe centrifuge. Adaptée de http://gpip.cnam.fr/ressources-pedagogiques-ouvertes/hydraulique/co/pompe-centrifuge_les_composants_jpg.html.

La composition du perfusat peut varier, mais on retrouve généralement une solution tampon permettant de le maintenir à un pH physiologique, des ions afin de réguler l'osmolalité, des colloïdes tels que des dextrans ou de l'albumine afin de maintenir une pression oncotique, et du glucose comme source d'énergie (Van Raemdonck et al. 2013 ; Jing et al. 2018). Dans le cas d'une perfusion normothermique, un métabolisme normal est maintenu d'où l'addition de nutriments supplémentaires dans la solution de préservation tels que des acides aminés, des vitamines et des lipides (Jing et al., 2018). Enfin, le perfusat peut être oxygéné à l'aide d'un oxygénateur. Des études sont en cours pour évaluer de nouvelles méthodes d'oxygénation comme l'addition de transporteurs d'oxygène basés sur de l'hémoglobine d'origine humaine, bovine ou porcine, ou plus récemment issue de vers marins (Njoku et al. 2015 ; Kasil et al. 2019).

De nombreuses machines de perfusion commerciales existent telles que OCS Lung (Transmedics), Vivoline LS1 (Vivoline Medical), Lung Assist (Organ Assist) et XPS (XVIVO Perfusion) pour les poumons, OCS Heart (Transmedics) pour le cœur, LifePort Kidney Transporter (Organ Recovery Systems), RM3 (Waters Medical Systems) et Kidney Assist (Organ Assist) pour les reins et LifePort Liver Transporteur (Organ Recovery Systems) et Liver Assist (Organ Assist) pour le foie (Van Raemdonck et al., 2013). Cependant, leur utilisation en clinique n'est pas systématique et la perfusion n'a pas encore remplacé la technique de stockage à froid, en raison de leur coût élevé : elles sont principalement utilisées dans le cas des organes marginaux.

Des études sont en cours pour étendre leur usage à d'autres organes comme le pancréas ou les intestins (Narayan et al. 2014 ; Barlow et al. 2015).

A l'avenir, l'utilisation des machines de perfusion pourrait permettre la prolongation de la durée de préservation des greffons et leur reconditionnement en vue d'une transplantation, mais également d'améliorer leur état et de réparer les potentiels dommages.

Que ce soit dans le cadre de la circulation extra-corporelle ou de la transplantation d'organes, les machines de perfusion comportent sensiblement les mêmes éléments : une ou plusieurs pompes, un oxygénateur et un échangeur thermique (Boettcher et al. 2003 ; García Sáez et al. 2014 ; Barlow et al. 2015).

2.2.2. Les pompes

Deux types de pompes sont utilisées dans le cadre de la perfusion d'organes : les pompes à galets ou les pompes centrifuges (Boettcher et al. 2003 ; Chassot et al. 2010) (**Figure 22**). Ces pompes ne sont pas les mêmes que celles décrites précédemment pour la perfusion, les besoins en termes de débits étant différents. En effet, les débits moyens utilisés pour l'administration de composés par perfusion sont de l'ordre de quelques millilitres ou litres par heures. Dans le cas de la perfusion d'organes *ex vivo*, les débits sont proches du débit sanguin *in vivo*, de l'ordre de quelques litres par minutes.

La pompe à galet ou pompe péristaltique est composée d'un tube souple comprimé par un rotor sur lequel sont fixés des galets. La rotation des galets permet la déformation du tube et donc le déplacement du sang. L'avantage de ce type de pompe est qu'il est possible de maintenir un débit constant quelle que soit la pression artérielle.

La pompe centrifuge est composée d'une turbine rotative entraînée par un électro-aimant. La rotation de la turbine à grande vitesse permet la propulsion du sang. Ce type de pompe étant plus onéreux et étant plus sensible aux variations de la pression artérielle, il n'est que peu utilisé en clinique.

2.2.3. Les oxygénateurs

Depuis la fin du 19^e siècle et jusqu'au milieu du 20^e siècle, les ingénieurs n'ont cessé de réfléchir aux différentes façons d'oxygéner le sang, notamment avec la création des oxygénateurs à disques et des oxygénateurs à bulles. Le principe de l'oxygénateur à disque est basé sur la rotation de disques qui entraîne la formation d'un fin film de sang, en contact direct avec un flux d'oxygène. Dans un oxygénateur à bulles, le sang est oxygéné par barbotage de bulles d'oxygène. Dans les deux cas, le sang est en contact direct avec l'air, ce qui entraîne de nombreux problèmes de dénaturation des protéines sanguines, et d'embolie gazeuse (Boettcher et al. 2003).

Afin de pallier ce problème, de nouvelles techniques inspirées des membranes de dialyse rénale ont été développées afin d'oxygéner le sang tout en limitant le contact direct avec l'air. Les premiers oxygénateurs à membrane sont apparus dans les années 1960 et sont encore utilisés aujourd'hui. Ils sont composés de membranes semi-perméables d'une épaisseur de 80 à 150 μm avec des pores de 0,3 à 0,7 μm de diamètre. En polypropylène, en silicone ou en Teflon, ces dernières ont une grande surface d'échange totale, allant de 1,8 à 2,5 m^2 , arrangée en tubules. La solution à oxygéner circule à l'extérieur des tubules et l'oxygène circule à l'intérieur (Chassot et al., 2010).

2.2.4. L'échangeur thermique

L'échangeur thermique est généralement couplé à l'oxygénateur. Son rôle est de réguler la température du sang à 37°C par le biais d'un échangeur dans lequel le sang circule, et à l'intérieur duquel se trouve un serpentín rempli d'eau thermalisée (Chassot et al., 2010).

Tableau 1. Récapitulatif des caractéristiques des différentes techniques d'imagerie de la distribution tissulaire d'un composé. MARG : Micro-autoradiographie, QWBA : Autoradiographie quantitative du corps entier (Quantitative Whole Body Autoradiography), PET : Tomographie par émission de positons (Positron Emission Tomography), MADI-MSI : Spectrométrie de masse par ionisation par désorption laser assistée par matrice (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Mass Spectrometry Imaging)

Technique d'imagerie	Autoradiographie		PET	Tomographie à rayons X	MALDI-MSI	Microscopie de fluorescence
	MARG	QWBA				
Composé	Marqué avec un radioisotope			Agent de contraste	Ionisable	Couplé à un fluorophore
Résolution spatiale	100 nm	50 – 100 μm	1,5 mm	10 – 100 μm	25 – 100 μm	200 nm en x et y 600 nm en z
Quantitative / Semi-quantitative	Quantitative			Semi-quantitative	Quantitative	Semi-quantitative
Destructive / Non destructive	Destructif		Non-destructif		Destructif	Destructif
3D	Non		Oui		Non	Oui

Partie 4. Les techniques d'étude de la distribution tissulaire d'un composé

La pharmacocinétique désigne l'étude du devenir d'un médicament après son administration dans l'organisme. Elle regroupe quatre processus : l'Absorption du médicament, sa Distribution dans l'organisme, sa Métabolisation et son Elimination (ADME). La distribution tissulaire d'un composé joue un rôle majeur dans les réponses toxicologiques et pharmacologiques de l'organisme. Il est donc primordial de pouvoir étudier ce phénomène.

Cependant, l'étude la distribution tissulaire n'est pas aisée, notamment lorsque les récepteurs pharmacologiques du composé sont situés dans des tissus peu perfusés, ou dans les espaces intercellulaires (Lanao and Fraile, 2005).

Les méthodes traditionnelles d'étude de la distribution tissulaire consistent à collecter du fluide interstitiel par microdialyse afin de l'analyser, ou bien à homogénéiser des biopsies de tissu afin d'évaluer leur concentration en composé (Lanao and Fraile, 2005). Une autre option consiste à utiliser des techniques d'imagerie, afin de visualiser la distribution d'un composé dans un tissu, un organe, ou un organisme. Dans cette partie, nous nous intéresserons uniquement à ces techniques d'imagerie dont nous dresserons une liste non exhaustive. Toutes ces techniques n'ont toutefois pas été utilisées dans le cadre de cette thèse. Cette partie a pour but d'éclairer le lecteur sur les techniques qui pourraient être mises en place.

Différentes méthodes d'imagerie peuvent être utilisées afin d'évaluer la distribution tissulaire d'un composé (**Tableau 1**). Ces techniques peuvent être qualitatives ou quantitatives, invasives ou non-invasives, et de nature destructive ou non destructive. Chacune présente ses avantages et ses limites (Grégoire et al., 2019). Peu de molécules possèdent des propriétés intrinsèques qui permettent leur imagerie directe dans le corps. Ainsi, il est souvent nécessaire de coupler le composé à étudier à un marqueur, une sonde ou un traceur (Williams, 2012).

1. Les techniques basées sur l'utilisation de radioisotopes

1.1 L'autoradiographie

L'autoradiographie est une technique d'imagerie pour laquelle des particules émises par un marqueur radioisotope interagissent avec une émulsion photographique, afin de produire une image (Solon, 2012). La source de radiation est présente dans le tissu à étudier, d'où le nom d'autoradiographie (Lanao and Fraile, 2005).

1.1.1. Principe

Le composé dont on veut évaluer la distribution est marqué à l'aide d'un radioisotope. Ce nucléide radioactif peut être du Tritium (^3H), du Carbone 14 (^{14}C), du Soufre 35 (^{35}S) ou bien de l'Iodine 125 (^{125}I) (Lanao and Fraile 2005 ; Solon 2015). Le composé marqué est ensuite administré dans l'organisme.

Deux types d'autoradiographies peuvent être réalisées :

- La micro-autoradiographie (MARG pour Micro-AutoRadioGraphy en anglais),
- L'autoradiographie quantitative du corps entier (QWBA pour Quantitative Whole Body Analysis en anglais).

La micro-autoradiographie permet d'évaluer la distribution d'un composé à l'échelle submicrométrique: des biopsies issues de l'organisme à étudier sont congelées, afin de réaliser des coupes cryologiques de 4 à 10 μm d'épaisseur, et déposées sur des lames de verre (Solon, 2015). La résolution de la micro-autoradiographie est de l'ordre d'une centaine de nanomètres. (Grégoire et al., 2019).

L'autoradiographie quantitative du corps entier permet d'évaluer la distribution d'un composé à l'échelle macroscopique : l'organisme à étudier est sacrifié et congelé, afin de réaliser des coupes cryologiques de 20 à 50 μm d'épaisseur (Solon, 2015). Cette technique d'imagerie permet de visualiser la distribution tissulaire dans l'ensemble du corps avec une résolution de 50 à 100 μm (Grégoire et al., 2019).

1.1.2. Techniques de détection

a. *L'émulsion photographique*

L'émulsion photographique est un mélange de gélatine et de cristaux de bromure d'argent. Cette émulsion est appliquée sur la coupe à analyser. Les rayonnements émis par le composé marqué par le radioisotope transforment le bromure d'argent en argent métallique, on parle alors d'impression de l'émulsion. L'émulsion est ensuite développée de la même manière qu'un film, à l'aide d'un développeur et d'un fixateur. Les grains d'argent étant opaques à la lumière, les lames peuvent être observées au microscope optique, afin de visualiser la distribution du composé qui apparaît sous forme de tâche noire.

La fiabilité avec laquelle la tâche obtenue correspond à la zone où la source radioactive est présente dépend du radioisotope utilisé : les isotopes radioactifs de faible énergie comme le Tritium ou le Carbone 14 vont permettre l'obtention d'images très proches de la réalité, tandis que l'Iodine 125 permet une moins bonne résolution de l'image (Solon, 2015).

L'analyse peut être couplée avec des techniques d'immunohistochimie, afin de corrélérer la distribution du composé avec ses cibles cellulaires (Solon, 2015).

L'inconvénient de cette technique de détection est qu'elle ne permet pas de quantifier la concentration du composé dans le tissu, en raison de l'absence de standards de calibration interne, et des potentiels artéfacts engendrés par le processus de préparation des échantillons (Solon, 2015).

f. *L'écran photostimulable*

L'écran photostimulable est composée d'un support en polyester, recouvert d'une fine couche de cristaux de luminophore, et d'une feuille de protection inerte. Le luminophore le plus couramment utilisé est le fluoro-bromure de baryum dopé à l'euporium (BaBrF, Eu^{++}). Lorsque l'écran photostimulable entre en contact avec le composé marqué par le radioisotope, le cation d'euporium est oxydé et un photoélectron est excité dans la

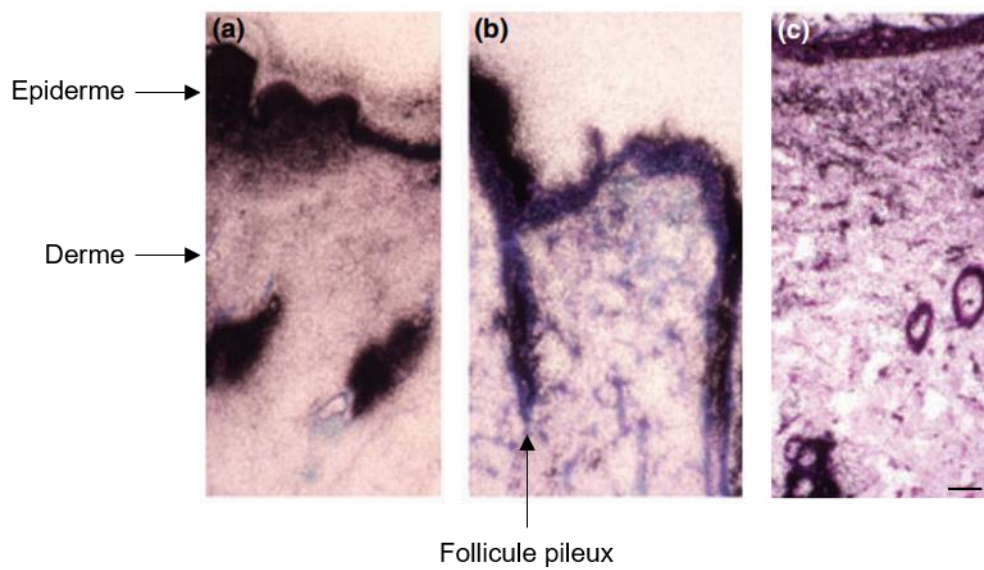


Figure 23. Micro-autoradiographie d'une coupe de peau de rat. Les tâches noires représentent les zones où l'œstradiol marqué avec du Tritium (^3H) est présent. Adaptée de Stumpf et al. 2008 (Stumpf et al., 2008).

bande de conduction du cristal. Ces photoélectrons sont piégés sous un état demi-stable, constituant l'image latente.

L'image latente est ensuite lue par un lecteur qui scanne la plaque à l'aide d'un laser. Cette stimulation permet la libération des électrons, dont le retour à l'état fondamental s'accompagne d'une émission de luminescence, proportionnelle au nombre de photons absorbés (Zhang et al., 2011).

Une image digitale de la distribution du composé est ainsi obtenue. L'avantage de ce type d'imagerie est qu'il permet l'obtention de données quantitatives, grâce à l'utilisation de standards de calibration (Solon, 2015).

1.1.3. Avantages et inconvénients de l'autoradiographie

L'autoradiographie permet d'obtenir une carte de la distribution spatiale et temporelle d'un composé, dans un tissu, un organe ou un organisme donné. De plus, selon la technique de détection utilisée, des données quantitatives peuvent être extraites de l'organisme.

En revanche, elle présente aussi de nombreuses limites. Tout d'abord, c'est une technique très invasive dans le cas de la micro-autoradiographie, voire destructive dans le cas de l'autoradiographie quantitative du corps entier. En effet, la première nécessite la réalisation de biopsies dans l'organisme à étudier, et la deuxième nécessite l'euthanasie de celui-ci (Lanao and Fraile 2005 ; Solon 2012, 2015). Une autre limite importante est le manque de spécificité de l'autoradiographie : la radioactivité mesurée correspond à la radioactivité totale de l'échantillon, sans distinction entre le composé parent et ses métabolites (Lanao and Fraile, 2005). Enfin, la préparation des échantillons pour l'autoradiographie est un processus très long qui peut durer de plusieurs jours à plusieurs mois pour obtenir une résolution optimale (Grégoire et al. 2019).

1.1.4. Exemples d'application de l'autoradiographie à l'imagerie de la peau

L'autoradiographie a été utilisée comme technique d'évaluation de la distribution d'un composé dans la peau pour la première fois en 1956. L'étude avait pour but d'étudier la pénétration d'hydrocortisone appliquée en topique, sur des personnes volontaires. Cette technique très invasive a nécessité la réalisation de cinq biopsies par individu (Scott and Kalz 1956 ; Grégoire et al. 2019).

L'autoradiographie a ensuite été utilisée chez de nombreuses espèces différentes, pour l'étude de la pénétration de différents composés (Rutherford and Black 1969 ; Touitou et al. 1988 ; Grégoire et al. 2019).

La sensibilité de la technique s'est améliorée dans les années 90, permettant l'analyse de la distribution au niveau subcellulaire (Bidmon et al. 1990 ; Grégoire et al. 2019).

La **Figure 23** présente un exemple d'autoradiographie réalisée *in vivo* sur des rats (Stumpf et al. 2008 ; Grégoire et al. 2019), afin d'étudier la pénétration d'œstradiol marqué avec du Tritium et appliqué en topique. Les images obtenues permettent de visualiser la pénétration du composé à travers l'épiderme (**Figure 23.a**), et par voie trans-folliculaire (**Figure 23.b**). La rétention des composés dans la couche cornée peut également être observée (**Figure 23.c**).

1.2 La tomographie par émission de positons (PET)

1.2.1. Principe

Tout comme l'autoradiographie, la tomographie par émission de positons nécessite l'administration dans l'organisme d'un composé marqué avec un radioisotope. Ce nucléide radioactif peut être du Carbone 11 (^{11}C), de l'Azote 13 (^{13}N), de l'Oxygène 15 (^{15}O) ou du Fluor 18 (^{18}F). En revanche, contrairement à l'autoradiographie, ce sont les positons émis par les radioisotopes qui sont détectés en dehors du tissu. Cette technique d'imagerie permet d'obtenir des coupes transversales du tissu, de l'organe ou de l'organisme à étudier. Des sections multiples sont prises en simultanément, afin de reconstruire par la suite le volume en trois dimensions (Lanao and Fraile, 2005).

1.2.2. Technique de détection

Les radioisotopes utilisés comme marqueurs émettent des positons. Lorsqu'un positon entre en collision avec un électron, ces deux particules sont annihilées, ce qui provoque la formation de deux rayons gamma, éjectés en deux positions opposées. La détection de deux événements en simultanément est identifiée et supposée comme étant la détection de ces deux rayons gamma. Ainsi, la zone d'où les rayons gamma proviennent est détectée, et correspond à la zone où le composé marqué est présent (Williams, 2012).

1.2.3. Avantages et inconvénients de la tomographie par émission de positons

Contrairement à l'autoradiographie, la tomographie à émissions de positons est une technique d'imagerie non destructive, puisque la détection se fait en dehors de l'organisme. Elle peut donc être appliquée *in vivo* sur des êtres vivants. De plus, cette technique permet de reconstruire en trois dimensions le tissu, l'organe ou l'organisme étudié.

En revanche, tout comme l'autoradiographie, la radioactivité mesurée correspond à la radioactivité totale, sans distinction entre le composé initial et ses métabolites. De plus, les radioisotopes ayant une faible durée de demi-vie (de 90 à 120 minutes pour le Carbone 11), le suivi de la distribution tissulaire dans le temps est limité (Lanao and Fraile, 2005). Enfin, bien qu'elle permette de réaliser de l'imagerie profonde cette technique n'offre qu'une résolution limitée, de l'ordre de 1,5 mm, ce qui la rend peu adaptée à l'étude de la distribution de composés dans la peau.

2. La tomographie à rayons X

2.1.1. Principe

Le principe de la tomographie à rayons X repose sur l'étude des variations du niveau d'absorption des rayons X dans un échantillon (Stock, 1999). Des radiographies sont prises à différents angles sur 360°, afin d'obtenir une image volumique qui retourne une valeur liée au coefficient d'absorption des rayons X de l'échantillon en chaque position de l'espace (Thiery, 2013).

Un agent de contraste est généralement utilisé afin de rendre possible la visualisation d'une structure qui présente peu de contraste d'absorption. Cet agent incorpore généralement un élément de numéro atomique élevé comme l'iode ou le baryum et est utilisé sous la forme d'une solution aqueuse. Dans le cadre de la tomographie à rayons X, les agents de contraste utilisés sont des composés iodés hydrosolubles (Iodure de Potassium).

Lorsque les temps d'acquisitions sont compatibles avec les vitesses de certains phénomènes physiques, il est possible de réaliser des mesures hydrodynamiques et de réaliser un suivi en temps réel des concentrations (Thiery, 2013).

2.1.2. Technique de détection

Les rayons X générés par la source traversent l'échantillon à analyser et sont ensuite projetés sur un écran doté d'une matrice de capteurs. L'énergie des rayons X tout comme l'intensité de la source peuvent être adaptés à l'échantillon à analyser. Cette technique permet d'accéder au cœur de l'échantillon afin d'évaluer ses différences de composition, ses hétérogénéités ainsi que les vides ou les singularités qui le composent (Thiery, 2013). La tomographie à rayons X permet d'obtenir des images avec une résolution de 10 à 100 µm (Stock, 1999). Pour un capteur donné, la tomographie reposant sur une méthode de projection, la résolution dépend principalement de la taille de l'échantillon observé.

2.1.3. Avantages et inconvénients

Le principal avantage de la tomographie à rayons X est que c'est une technique non invasive et non destructive. Elle permet donc l'analyse répétée d'un même échantillon, à différents intervalles de temps (Stock, 1999). De plus, c'est une des rares techniques permettant la reconstruction d'un volume en trois dimensions.

En revanche, la tomographie à rayons X ne permet pas l'analyse de la distribution de tous les composés puisqu'elle nécessite l'utilisation d'un agent de contraste. Les molécules d'intérêts peuvent éventuellement être mélangées à un agent de contraste en solution. Cependant, cela risque de modifier la viscosité et les propriétés physico-chimique du composé (Thomsen et al., 2012). Les différences de coefficient de diffusion entre l'agent de contraste et les espèces d'intérêt doivent également être prises en compte

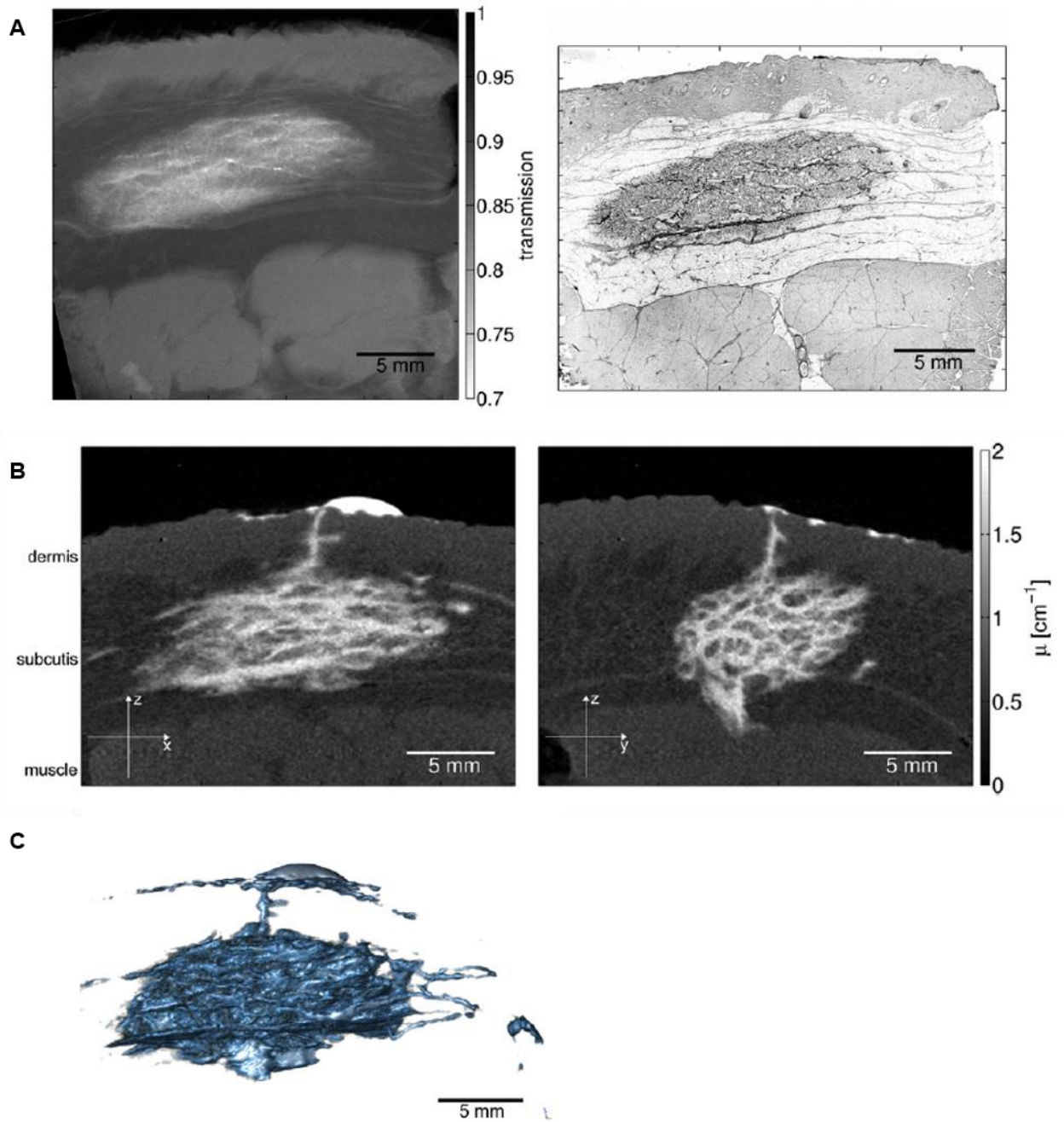


Figure 24. Tomographie aux rayons X d'une coupe de biopsie de peau de porc. Une solution d'insuline mélangée à un agent de contraste a été injectée en sous-cutanée dans des biopsies de peau de porc. **(A)** Comparaison entre la structure du dépôt visualisé en radiographie à rayons X sur une coupe de 2 mm d'épaisseur (à gauche) et sur une coupe histologique colorée de 20 μm d'épaisseur. **(B)** Reconstruction 3D d'une biopsie de peau de porc injectée avec le mélange insuline/agent de contraste en tomographie à rayons X, selon deux plans de coupe. **(C)** Segmentation du dépôt d'insuline par un algorithme de Chan-Vese. (Thomsen et al., 2012).

2.1.4. Exemple d'application de la tomographie à rayons X à l'imagerie de la peau

En 2012, une équipe de recherche a utilisé la tomographie à rayons X afin d'évaluer la distribution de l'insuline dans de la peau de cochon après une injection sous-cutanée (Thomsen et al., 2012). Pour ce faire, une solution d'insuline et d'un agent de contraste iodé, le Xenetic 300, a été injectée dans l'hypoderme d'une biopsie de cochon.

Afin d'évaluer l'impact de l'agent de contraste sur les propriétés physico-chimiques de l'insuline et sur la modification structurale du dépôt formé suite à l'injection de cette solution, les chercheurs ont tout d'abord réalisé des images en radiographie à rayons X sur des coupes de 2 mm d'épaisseur réalisées dans la biopsie. Ces coupes ont ensuite été recoupées à une épaisseur de 20 μm et une coloration de l'insuline a été réalisée (**Figure 24.A**). Les résultats obtenus montrent un dépôt sensiblement identique sur les deux images, démontrant qu'il n'y a pas de séparation des deux composés lors de l'injection, et confirmant que le dépôt visualisé en radiographie à rayons X peut être assimilé au dépôt de l'insuline.

Des acquisitions en tomographie à rayons X ont ensuite été réalisées sur des biopsies entières, préalablement injectées avec la solution d'insuline et d'agent de contraste et congelées. La **Figure 24.B** présente la reconstruction 3D obtenue, selon deux plans de coupes. La solution injectée apparaît en blanc.

Le volume obtenu a finalement été segmenté à l'aide d'un algorithme de Chan-Vese (**Figure 24.C**).

3. Microscopie de fluorescence

La microscopie de fluorescence permet d'étudier la distribution tissulaire de composés naturellement fluorescents, ou couplés à un fluorophore. Il existe différentes techniques de microscopie de fluorescence. Dans cette partie, nous nous intéresserons principalement à la microscopie de fluorescence conventionnelle, et à la microscopie confocale.

3.1 Principe et technique de détection

Les deux méthodes citées précédemment sont basées sur le principe d'excitation linéaire à un photon. Lorsqu'une molécule fluorescente absorbe un photon, elle passe à un état excité, puis retourne en quelques nanosecondes à son état fondamental, en émettant un photon fluorescent (Pena et al., 2020).

Les molécules fluorescentes contiennent généralement des structures aromatiques, et sont excitées dans des longueurs d'onde correspondant aux ultraviolets, à la lumière visible ou aux infrarouges (Pena et al., 2020).

3.1.1. La microscopie de fluorescence conventionnelle

Un faisceau de lumière parallèle, provenant d'une source LED ou d'une lampe à décharge est filtré par un filtre d'excitation, puis vient éclairer l'échantillon placé sous l'objectif du microscope. La fluorescence émise par l'échantillon est ensuite collectée et séparée de la

lumière d'excitation grâce à des miroirs dichroïdes et des filtres optiques. Enfin, cette lumière est détectée par une caméra (Pena et al., 2020).

L'inconvénient majeur de la méthode conventionnelle est qu'elle ne permet d'imager que des échantillons peu épais, de moins de 10 μm d'épaisseur, afin d'obtenir une image nette.

3.1.2. La microscopie de fluorescence confocale

La microscopie confocale permet de palier la limite d'épaisseur des échantillons de la microscopie de fluorescence conventionnelle (Pena et al., 2020). En effet, celle-ci permet de visualiser la fluorescence de composés jusqu'à 50 à 70 μm de profondeur, avec une résolution en z de 600 nm environ.

Contrairement à la méthode conventionnelle, l'échantillon n'est pas illuminé en continu, mais scanné avec un faisceau laser focalisé dans le tissu à l'aide d'une lentille. Dans le cas de la microscopie confocale, la fluorescence n'est collectée que sur le plan focal, permettant ainsi d'obtenir des images plus contrastées que la méthode conventionnelle. Une image en deux dimensions peut être obtenue en scannant en x et en y, ou bien un volume peut être reconstruit en 3D en réalisant un empilement des scans 2D obtenus (Pena et al., 2020).

Pour chacune des deux techniques présentées, l'analyse peut être couplée avec une acquisition en lumière transmise afin de corrélérer la distribution de la fluorescence obtenue à la morphologie du tissu (Pena et al., 2020).

3.2 Avantages et inconvénients

L'avantage majeur de la microscopie de fluorescence est la facilité de sa mise en place. Les marqueurs fluorescents sont relativement stables, aucun marqueur radioisotopique n'est nécessaire, la logistique est donc simplifiée et les coûts et les risques réduits (Lanao and Fraile 2005 ; Williams 2012). De plus, elle permet l'obtention d'images nettes, avec une bonne résolution latérale (Lanao and Fraile, 2005), de l'ordre de 200 nm.

La première limite de cette technique réside dans la faible profondeur de détection de la fluorescence, limitant la taille des échantillons pouvant être analysés (Williams, 2012). De plus, une limite communément rencontrée vient de la fluorescence naturelle de certains tissus ou matériaux. Certains composés endogènes émettent de la fluorescence naturellement, tels que le collagène ou l'élastine (Pena et al., 2020). Lorsque ces composés émettent un signal fluorescent dans la même longueur d'onde que le composé à analyser, la quantification et l'analyse de la distribution spatiale de la concentration sont plus difficiles (Lanao and Fraile 2005 ; Pena et al. 2020).

3.3 Exemple d'application de la microscopie de fluorescence à l'imagerie de la peau

Durant les dernières années, la microscopie de fluorescence a été particulièrement utilisée dans le cadre du développement de systèmes permettant l'administration de médicaments par voie transdermique. L'objectif de ces systèmes est d'améliorer la pénétration cutanée de composés à travers la couche cornée, par iontophorèse, ultrasons, microaiguilles, électroporation, etc. (Prausnitz and Langer 2008; Alkilani et al. 2015 ; Pena et al. 2020).

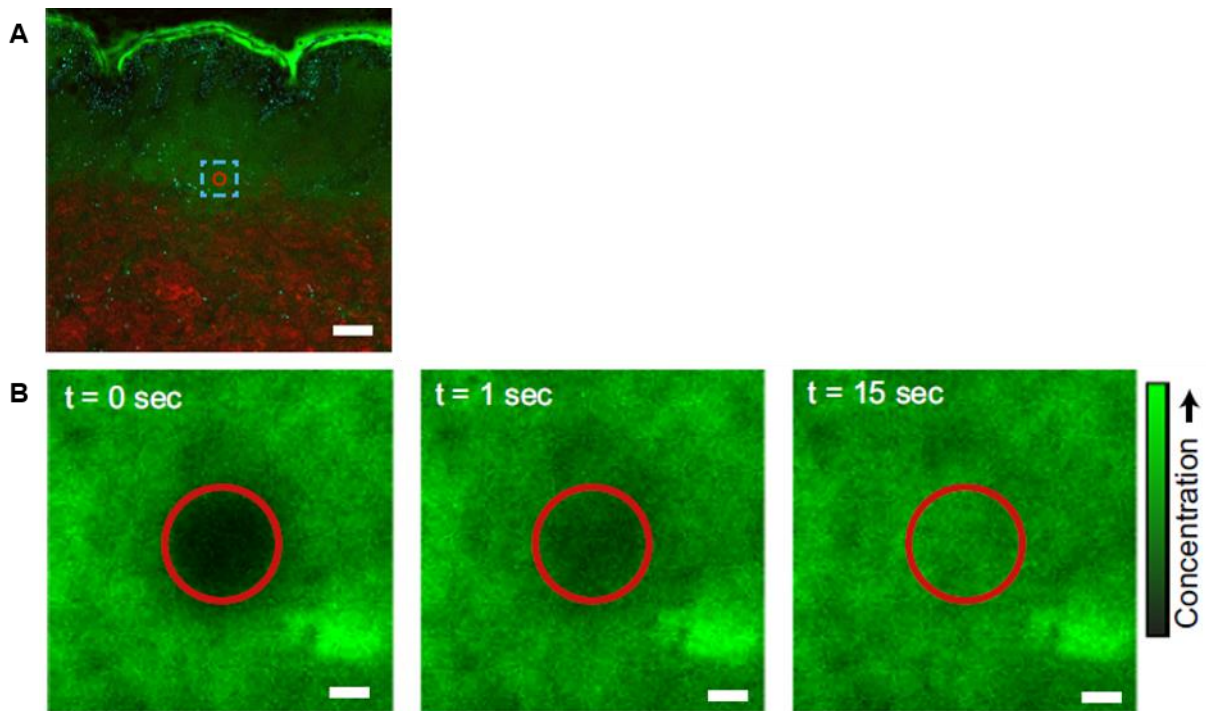


Figure 25. La technique de Fluorescent Recovery After Photobleaching (FRAP). (A) Acquisition réalisée au microscope confocal d'une coupe de peau humaine. La zone entourée en rouge correspond à la zone photoblanchie. Le carré bleu représente la zone de récupération de fluorescence. (B) Evolution de l'intensité de fluorescence dans la zone photoblanchie au cours du temps. Cette variation de l'intensité est corrélée à la variation de concentration. Barre d'échelle : 10 μm . (Römgens et al., 2015).

Dans un autre contexte, la microscopie de fluorescence peut également être utilisée afin de calculer le coefficient de diffusion de composés. Pour cela, la technique de redistribution de fluorescence après photoblanchiment (FRAP pour Fluorescent Recovery After Photobleaching en anglais) est intéressante (Cornelissen et al. 2008 ; Römogens et al. 2015 ; Nguyen et al. 2018). Le principe de cette technique consiste à induire le photoblanchiment (photobleaching) d'une molécule fluorescente distribuée de façon homogène dans un tissu puis à étudier la redistribution du signal de fluorescence dans la zone affectée, du fait de la diffusion de la molécule. Cette redistribution est mesurée dans le temps, afin d'en extraire un coefficient de diffusion.

Cette technique a par exemple été utilisée pour étudier le profil de diffusion d'un dextran de 40 kDa dans une biopsie de peau humaine (Römogens et al., 2015) (**Figure 25**). Pour ce faire, une biopsie d'environ 8 mm par 8 mm contenant l'épiderme, le derme et l'hypoderme a été coupée perpendiculairement à l'épiderme et immergée dans une solution de dextran de 40 kDa couplé à de la fluorescéine à 0,08 mg/mL pendant 20 heures, afin d'obtenir une distribution homogène du composé dans l'ensemble du tissu (**Figure 25.A**). La biopsie a ensuite été déposée sur la tranche sur une lamelle, et imagée par microscopie confocale. Une zone de 30 µm de diamètre a été photoblanchie avec un laser à une longueur d'onde de 488 nm, et à une puissance de 100 % (**Figure 25.B**).

4. La spectrométrie de masse par désorption/ionisation assistée par laser (MALDI-MSI)

4.1.1. Principe

Le principe de la spectrométrie de masse par désorption/ionisation assistée par laser (MALDI-MSI) repose sur l'analyse de la génération d'espèce ionisées générées depuis un échantillon à analyser après irradiation par un laser ultra-violet. Dans le cas de la peau, la première étape consiste à distribuer de façon homogène une matrice sur une fine coupe histologique de tissu, d'une épaisseur de 10 à 20 µm (Grégoire et al., 2019). Cette matrice a des propriétés d'absorption des rayons ultra-violets, et est généralement composée d'acides ou de bases organiques comme l'acide 2,5-dihydroxybenzoïque, l'acide α -cyano-4-hydroxycinnamique, l'acide sinapinique ou le 9-aminoacridine (Nishidate et al., 2019). La composition de la matrice est cependant variable et dépend du type de composé à analyser (Grégoire et al., 2019). La technique la plus couramment utilisée pour la distribution de la matrice sur la coupe histologique est la nébulisation pneumatique (Grégoire et al., 2019).

Les analytes présents dans l'échantillon sont extraits du tissu par le solvant, et co-cristallisent avec la matrice en séchant (Prideaux and Stoeckli, 2012). La matrice est ensuite irradiée à l'aide d'un laser UV pulsé, ce qui entraîne l'ionisation des analytes (Prideaux and Stoeckli 2012 ; Grégoire et al. 2019).

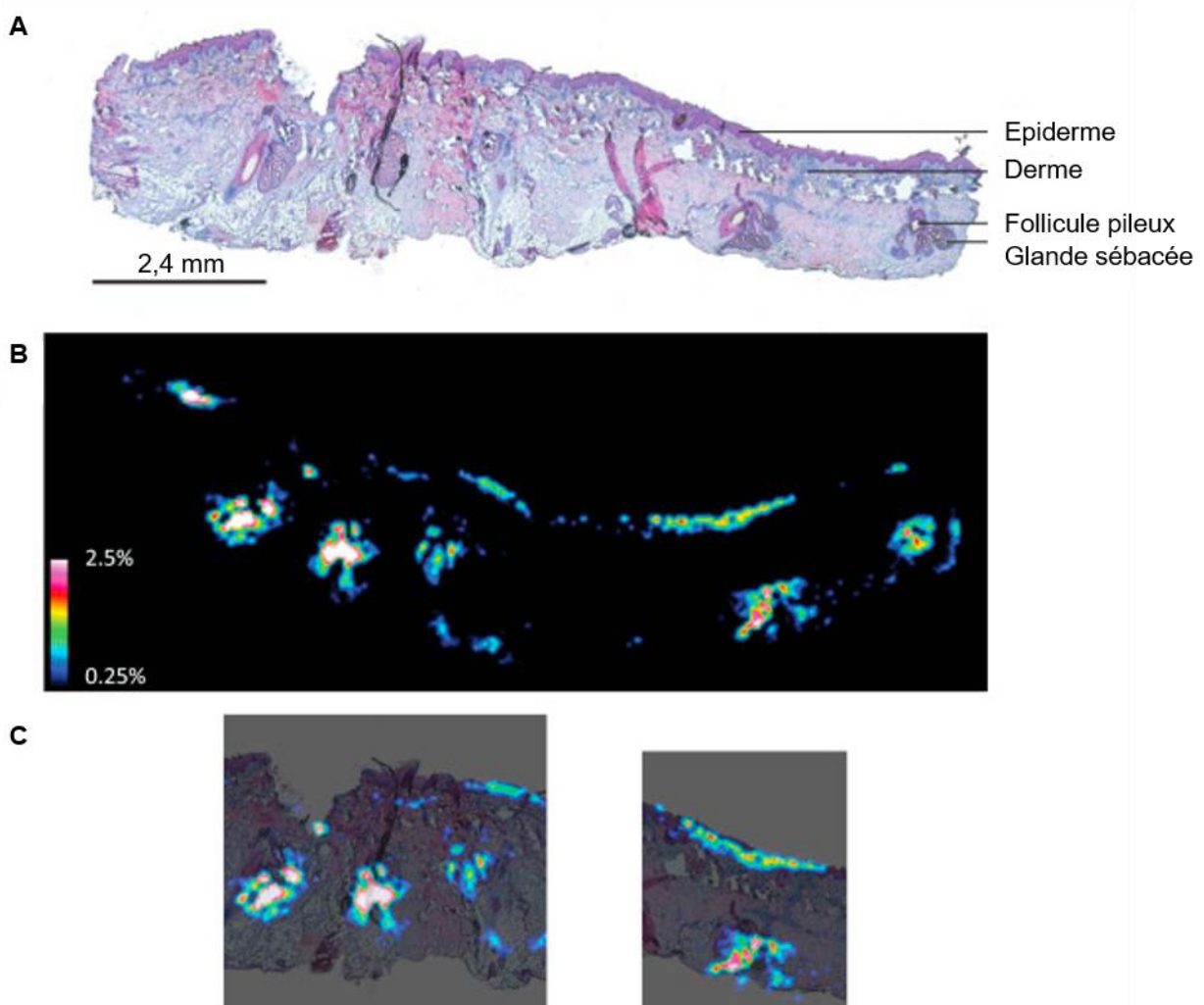


Figure 26. Spectrométrie de masse MALDI sur une coupe de peau d'oreille de cochon. (A) Coloration Hématoxyline et Eosine d'une coupe de peau d'oreille de cochon. **(B)** Imagerie MALDI-MSI d'une coupe de peau d'oreille de cochon traitée en topique avec de l'Olumacostat Glasaretil (OG) pendant 4 heures. La color map permet de distinguer les zones à forte concentration en OG (en blanc) des zones à faible concentration en OG (en noir). **(C)** Superposition des deux images obtenues (Hunt et al., 2017).

4.1.2. Technique de détection

Les ions formés sont collectés par un analyseur, afin d'être séparés, détectés et caractérisés en fonction de leur rapport masse/charge (m/z). Un spectre de masse est ainsi obtenu par balayage et analyse point par point de l'échantillon. Après traitement, les données obtenues permettent la visualisation de la distribution spatiale des différents composés présents dans l'échantillon (Grégoire et al., 2019).

4.1.3. Avantages et inconvénients

La technique de spectrométrie de masse MALDI a pour principal avantage l'obtention de données relatives au poids moléculaire des espèces détectées. Ainsi, cette technique d'imagerie permet d'évaluer la distribution tissulaire des composés d'intérêts et de leurs métabolites, mais également d'avoir une vue d'ensemble du microenvironnement du composé (Grégoire et al., 2019). Cette technique offre la possibilité d'imager des molécules de faible poids moléculaire, comme des molécules avec de plus gros poids moléculaire (Prideaux and Stoeckli, 2012). Un autre avantage majeur de cette technique en comparaison avec les autres méthodes d'imagerie est qu'il n'y a pas besoin de marqueur spécifique pour la détection, elle est donc applicable à un grand nombre de molécules (Grégoire et al., 2019).

En revanche, la spectrométrie de masse MALDI présente également de nombreuses limites, la première étant sa faible résolution (de 25 à 100 μm typiquement). Par ailleurs, un effet de matrice peut également être observé dans certains cas (Perry et al., 2020). En effet, lorsque les composés d'intérêts sont ionisés, les autres composés présents dans l'échantillon peuvent l'être également, entraînant une compétition qui est susceptible d'affecter l'efficacité d'ionisation de la molécule d'intérêt. Par exemple, lorsque le laser irradie une glande sébacée, la composition du tissu irradié est différente de celle de l'épiderme. L'efficacité d'ionisation entre ces deux zones sera donc potentiellement différente (Grégoire et al. 2019). Afin de pallier cette limite et de pouvoir normaliser l'analyse et ainsi permettre la quantification, il est nécessaire d'utiliser un étalon interne exogène, tel qu'un composé marqué avec un isotope stable, ou bien un composé analogue d'un point de vue structurel à la molécule d'intérêt (Nishidate et al. 2019 ; Grégoire et al. 2019).

4.1.4. Exemple d'application de la spectrométrie de masse MALDI à l'imagerie de la peau

La spectrométrie de masse MALDI a été appliquée à un échantillon de peau pour la première fois dans les années 2000 (Bunch et al., 2004). Cette technique d'imagerie est maintenant utilisée pour diverses applications, telles que l'évaluation de la pénétration cutanée de composés appliqués en topique (Bunch et al. 2004 ; Sørensen et al. 2017 ; Bonnel et al. 2018), ou bien pour évaluer la distribution dans la peau d'un médicament administré par voie orale (Nishimura et al., 2018).

La **Figure 26** présente un exemple d'utilisation de la spectrométrie de masse MALDI pour l'évaluation de la capacité de l'Olumacostat Glasaretil à atteindre les glandes sébacées, afin d'inhiber la production de sébum dans la peau (Hunt et al., 2017). Pour ce faire, la molécule d'intérêt a été appliquée en topique sur des oreilles de cochon pendant 4 heures.

La comparaison entre une coupe de peau colorée à l'Hématoxyline et l'Eosine (**Figure 26.A**) et l'image obtenue de la spectrométrie de masse MALDI (**Figure 26.B**), permet de localiser précisément les zones où du signal représentatif de la molécule d'intérêt est observé. Sur l'image MALDI-MSI, une cartographie (*heat map*) permet de distinguer les zones à forte intensité, où le composé d'intérêt est présent en plus forte concentration, de celles où le composé est présent en plus faible concentration. La superposition de ces deux images permet de démontrer l'accumulation préférentielle du composé dans les glandes sébacées (**Figure 26.C**).

OBJECTIFS DE LA THÈSE

L'objectif principal de mon projet de thèse a consisté à développer, valider et caractériser un modèle *ex vivo* de peau humaine perfusé : FlowSkin. Le but de ce flux intra-tissulaire est de permettre l'administration, la diffusion et la collecte de composés sur plusieurs jours, afin de favoriser les échanges de nutriments, d'oxygène ou de médicaments, mais également l'élimination des déchets métaboliques.

La stratégie envisagée a reposé sur l'implantation d'un dispositif microporeux dans le derme du modèle *ex vivo* de peau humaine NativeSkin® développé par la société Genoskin, et sa perfusion à l'aide d'un système microfluidique.

Ce projet a été réalisé en trois étapes :

- La mise en place d'un dispositif permettant de recréer un flux de liquide au sein de l'explant de peau humaine, et le développement d'un procédé permettant de maintenir le modèle perfusé en culture pendant plusieurs jours,
- Le développement de méthodes d'analyse de la diffusion de composés dans des explants de peau humaine,
- L'évaluation des effets de la perfusion sur le modèle FlowSkin afin de déterminer les paramètres de perfusion les plus adaptés, c'est-à-dire permettant le transport efficace des composés dans l'explant de peau sans toutefois endommager le tissu.

RÉSULTATS

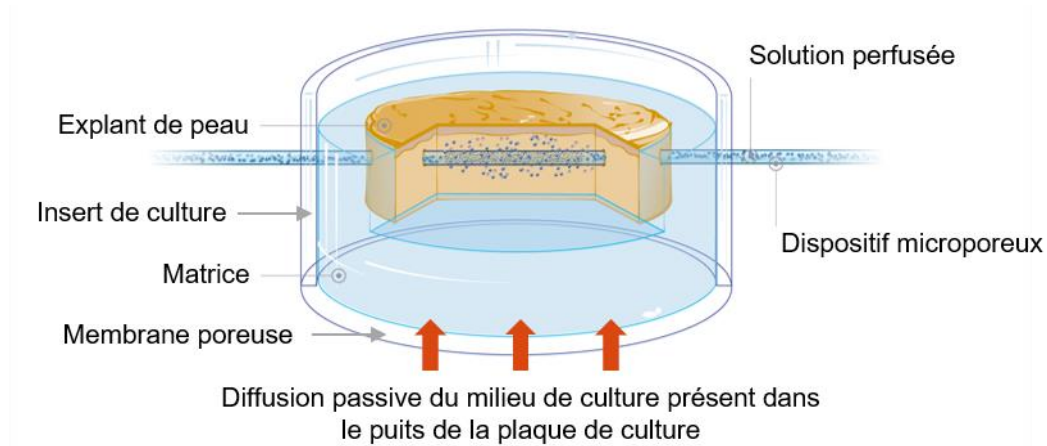


Figure 27. Présentation du modèle FlowSkin. Le modèle FlowSkin envisagé repose sur l'implantation d'un dispositif microporeux dans le derme de l'explant de peau du modèle NativeSkin®. Une solution est perfusée via ce dispositif.

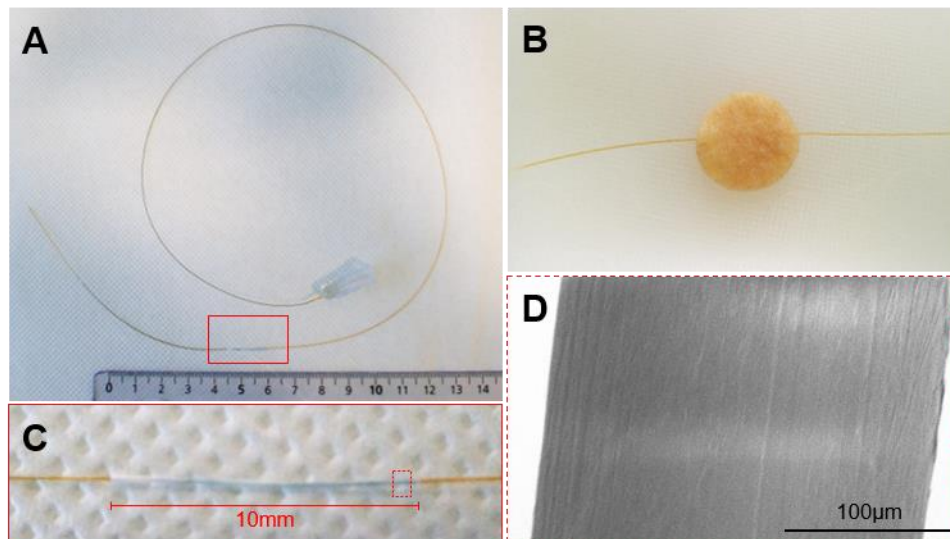


Figure 28. Présentation de la sonde de microdialyse. (A) La sonde de microdialyse CMA 31 Linear Microdialysis Probe (Harvard Apparatus) a un diamètre externe de 260 μm et un diamètre interne de 190 μm . Une membrane poreuse de 10 mm de longueur est présente sur la sonde. (B) La sonde peut être implantée de façon traversante, dans le derme d'une biopsie de peau de 15 mm de diamètre. (C) Vue zoomée de la partie poreuse de la sonde. (D) Vue zoomée (MEB) de la membrane poreuse en polyethersulfone (PES). La membrane a une limite de porosité (cut-off) de 55 kDa.

Partie 1 : Mise en place d'un flux intra-tissulaire dans un modèle de peau humaine *ex vivo*

Afin de développer un modèle *ex vivo* de peau humaine perfusé, permettant entre autres l'administration de composés dans le tissu, le premier objectif de mes travaux a consisté à mettre en place un dispositif permettant de recréer un flux de liquide au sein d'un explant de peau humaine et de développer un procédé permettant de maintenir l'explant perfusé en culture pendant plusieurs jours. La première partie de ce manuscrit est consacrée à la présentation des travaux de mise au point qui ont conduit à la production du modèle FlowSkin.

La méthodologie envisagée repose sur l'implantation d'un dispositif microporeux dans le derme du modèle de peau humaine *ex vivo* NativeSkin® (**Figure 27**), et à sa perfusion à l'aide d'un système de propulsion. Afin d'atteindre cet objectif, différents dispositifs poreux et différentes pompes ont été testés. Deux techniques d'implantation du dispositif dans le derme des biopsies de peau ont également été développées. Enfin, les consommables de culture cellulaire utilisés traditionnellement ont dû être adaptés pour permettre la culture du modèle de peau perfusé.

1. Présentation des différents dispositifs poreux testés

Afin d'établir un flux dans le derme d'explants de peau de 15 mm de diamètre, nous avons choisi d'implanter un dispositif dont la partie située au sein de la biopsie est poreuse. Pour cela, différentes options se sont présentées :

- L'utilisation de dispositifs poreux déjà utilisés en clinique pour des applications telles que la microdialyse,
- L'utilisation de cathéters déjà utilisés en clinique pour la perfusion, dans lesquels des pores sont créés.

1.1 Les sondes de microdialyse

Le premier dispositif poreux envisagé est la sonde de microdialyse linéaire. Les sondes sont composées d'un tube en polyimide, et d'une portion de fibre creuse semi-perméable en polyethersulfone. Ces sondes sont traditionnellement utilisées en clinique pour de la microdialyse cutanée (Rea and Kirby, 2019), ou bien pour la collecte de neurotransmetteurs dans le cerveau (Geeraerts et al. 2008 ; Glögler et al. 2016). Elles ont donc l'avantage d'être validées pour des implantations intradermiques, et considérées comme biocompatibles. Leur implantation est simple, grâce aux aiguilles-guide fournies (23 G, diamètre externe de 0,6 mm), et elles sont facilement connectables à un système microfluidique grâce au connecteur luer-lock femelle intégré (**Figure 28.A**).

Les sondes testées ont un diamètre externe de 260 μm et un diamètre interne de 190 μm . Leur membrane nanoporeuse, d'une longueur de 10 mm (**Figure 28.C**), a une limite de porosité (*cut-off*) de 55 kDa (**Figure 28.D**). De par leur souplesse et leur faible diamètre, aucune déformation de l'explant n'est observée, après implantation dans une biopsie de 15 mm de diamètre (**Figure 28.B**).

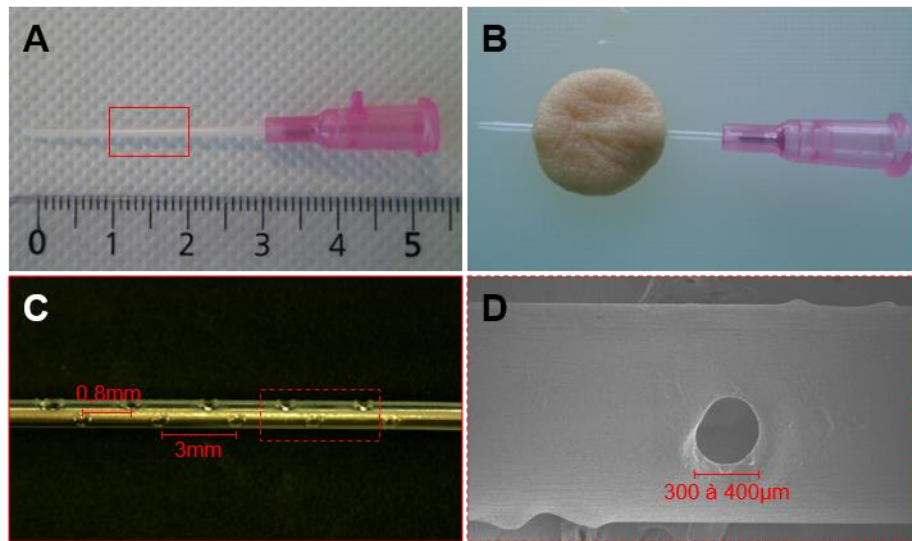


Figure 29. Présentation du premier type de cathéter microporeux. (A) Ce type de cathéter microporeux est obtenu par ablation laser d'un cathéter commercial en polyuréthane siliconé (Introcan Certo®, B-Braun) de 20 G (1,1 mm de diamètre externe et 0,9 mm de diamètre interne). La partie poreuse est centrée sur le cathéter, sur une longueur de 10 mm. (B) Le cathéter peut être implanté de façon traversante, dans le derme d'une biopsie de peau de 15 mm de diamètre. (C) Vue zoomée de la partie poreuse du cathéter. Les pores sont répartis sur quatre rangées distribuées de façon radiale à 90° les unes des autres, avec des espacements de 3 mm sur une même rangée, et de 0,8 mm à chaque rotation de 90°. (D) Vue zoomée (MEB) d'un pore. Les pores obtenus ont un diamètre compris entre 300 et 400 µm.

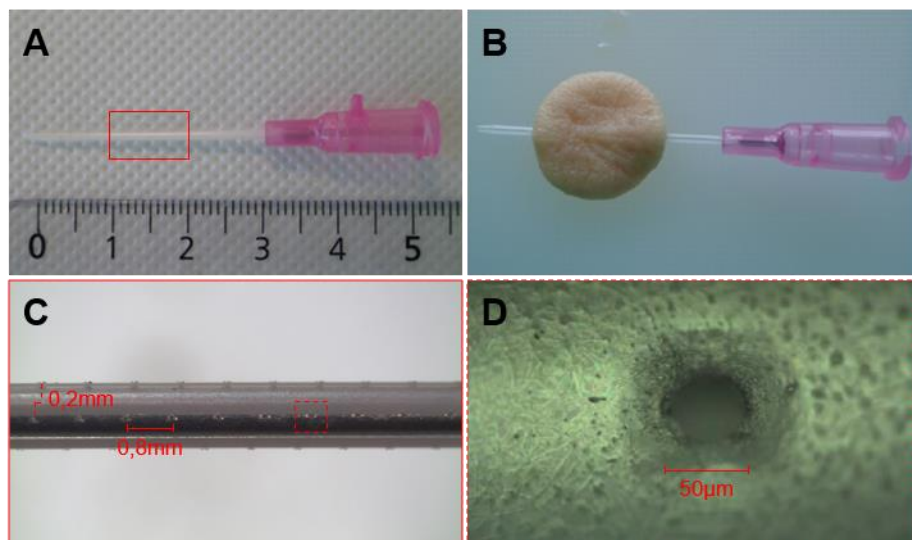


Figure 30. Présentation du deuxième type de cathéter microporeux. (A) Ce type de cathéter microporeux est obtenu par ablation laser d'un cathéter commercial en polyuréthane siliconé (Introcan Certo®, B-Braun) de 20 G (1,1 mm de diamètre externe et 0,9 mm de diamètre interne). La partie poreuse est centrée sur le cathéter, sur une longueur de 10 mm. (B) Le cathéter peut être implanté de façon traversante, dans le derme d'une biopsie de peau de 15 mm de diamètre. (C) Vue zoomée de la partie poreuse du cathéter. Les pores sont répartis sur quatre rangées distribuées de façon radiale à 90° les unes des autres, avec des espacements de 0,8 mm sur une même rangée, et de 0,2 mm à chaque rotation de 90°. (D) Vue zoomée (MEB) d'un pore. Les pores obtenus ont un diamètre de 50 µm.

Cependant, un phénomène d'obturation de la membrane et de la sonde a été observé après de longues périodes de culture (supérieures à 48 heures), rendant ce type de dispositif inadapté à notre utilisation (données non présentées).

1.2 Les cathéters microporeux

Le second dispositif poreux envisagé est un cathéter, dans lequel des pores sont créés par microfabrication. Ces cathéters veineux périphériques sont habituellement utilisés en clinique pour de la perfusion. Composés de polyuréthane siliconé, ils sont biocompatibles et adaptés à l'implantation dans le corps sur de longues périodes. Tout comme les sondes de microdialyse, ils sont facilement connectables à un système microfluidique grâce à leur connecteur luer-lock femelle intégré.

Les cathéters testés (20 Gauge) ont un diamètre externe de 1,1 mm, un diamètre interne de 0,9 mm et une longueur de 32 mm. Ils peuvent donc être facilement implantés dans des biopsies de 15 mm de diamètre, tout en conservant une longueur conséquente en sortie afin d'être insérés dans des tubes microfluidiques de 1/16" de diamètre interne. De par leur diamètre externe relativement élevé en comparaison avec les sondes de microdialyse, leur implantation dans les biopsies entraîne une déformation de l'explant (**Figure 29.B**).

Des pores ont été créés sur la partie centrale du cathéter, sur une longueur de 10 mm (**Figure 29.A**). Quatre rangées de pores sont distribuées de façon radiale sur le cathéter, à 90° les unes des autres. Cette disposition a été optimisée pour faciliter la tenue mécanique du cathéter.

Un premier type d'usinage de cathéter a été développé, à l'aide d'un système de gravure par ablation laser à CO₂. Un protocole spécifique d'usinage a été mis au point pour réaliser des pores d'un diamètre d'environ 400 µm, espacés de 3 mm sur une même rangée, et un décalage de 0,8 mm est opéré entre chaque rangée à chaque rotation de 90° (**Figure 29.C**). Cependant, ce type d'ablation laser ne permet pas d'obtenir des pores réguliers (**Figure 29.D**), le diamètre est peu précis, et la surface d'échange entre l'intérieur de cathéter et le tissu est trop importante avec des pores d'un tel diamètre.

Un second type d'usinage a donc été développé avec l'entreprise ALPhANOV (Bordeaux) dans le cadre d'un contrat de prestation. Ce type d'ablation à l'aide d'un laser à impulsion permet d'obtenir des pores réguliers d'un diamètre de 50 µm avec une incertitude de 3 µm (**Figure 30.D**). Pour ce type d'usinage, les pores sont espacés de 0,8 mm sur une même rangée et un décalage de 0,2 mm est opéré entre chaque rangée à chaque rotation de 90° (**Figure 30.C**).

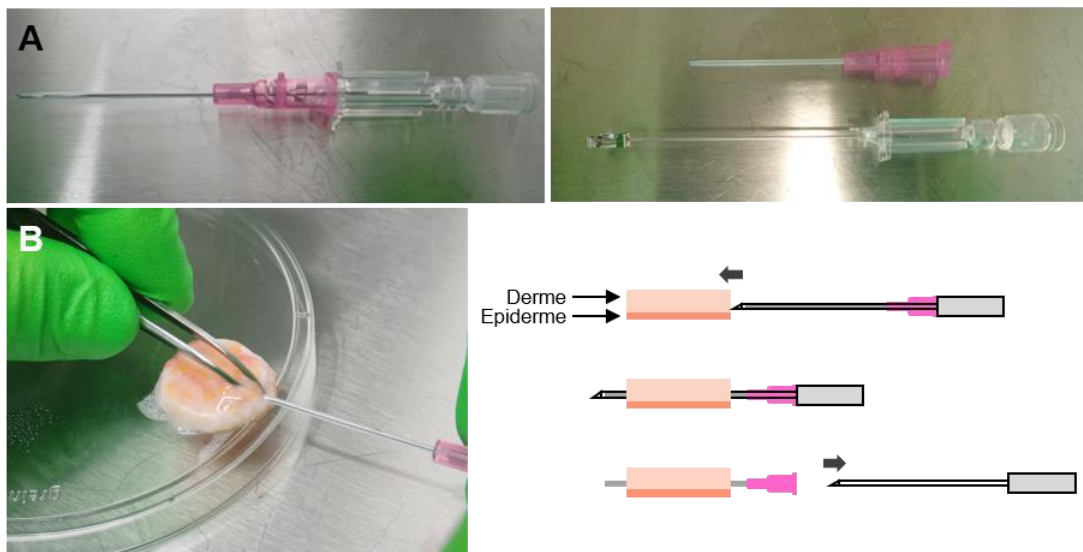


Figure 31. Présentation de la première technique d'implantation. (A) Présentation des deux parties qui composent le cathéter : une aiguille et une tubulure en plastique. **(B)** Implantation manuelle du cathéter à l'aide d'une pince courbe. Une fois le cathéter implanté de façon traversante, et centré dans la biopsie, l'aiguille est retirée et seule la tubulure plastique et sa connectique restent en place.

Le deuxième type de cathéter avec des pores de 50 μm de diamètre a été choisi comme dispositif poreux pour la suite du projet. Il est facilement implantable dans le derme des biopsies de peau, et son usinage est reproductible. Contrairement aux dispositifs de microdialyse, le diamètre des pores est suffisamment important pour permettre le passage de tout type de molécule sans limite dans le poids moléculaire et à priori sans engendrer les phénomènes d'obstruction mentionnés précédemment. Toutefois, il est important de noter que la taille des pores est supérieure à celle des cellules constituant le tissu et il sera important de vérifier que la cohésion et la structure de la peau ne sont pas affectées au niveau des pores. De plus, son implantation entraîne une déformation conséquente de la biopsie, dont les effets sur l'intégrité du tissu devront être étudiés.

2. Techniques d'implantation du dispositif

La production du modèle FlowSkin nécessite l'implantation du dispositif microporeux dans le derme d'un explant de peau de 15 mm de diamètre, de façon traversante, parallèlement à la surface. Deux techniques d'implantation ont été développées.

2.1 Implantation manuelle

La première technique développée consiste à implanter le dispositif manuellement (**Figure 31**).

Le cathéter est composé d'une tubulure plastique montée sur une aiguille (**Figure 31.A**). La biopsie est placée épiderme vers le bas, légèrement surélevée sur un support. À l'aide d'une pince courbe, la biopsie est maintenue fermement. L'aiguille du cathéter est alors implantée dans le derme, entre les deux doigts de la pince, le plus près possible de l'épiderme en faisant toutefois attention à ne pas le transpercer. Une fois le cathéter implanté de façon traversante, l'aiguille est retirée et seule la tubulure plastique reste en place (**Figure 31.B**).

2.2 Utilisation d'un outil de guidage imprimé en 3D

Afin d'implanter le dispositif de façon plus contrôlée et plus reproductible, une seconde technique a été développée. Celle-ci nécessite l'utilisation d'un outil de guidage imprimé en 3D.

L'outil est composé de deux pièces (**Figure 32.A**), qui se fixent grâce à des aimants. Dans la pièce inférieure, un emplacement est prévu pour la biopsie. Dans la pièce supérieure, une couronne et des ergots permettent de maintenir la biopsie en place durant l'implantation. Des fentes sont présentes dans chacune des deux pièces et forment un guide pour le cathéter une fois les deux parties assemblées.

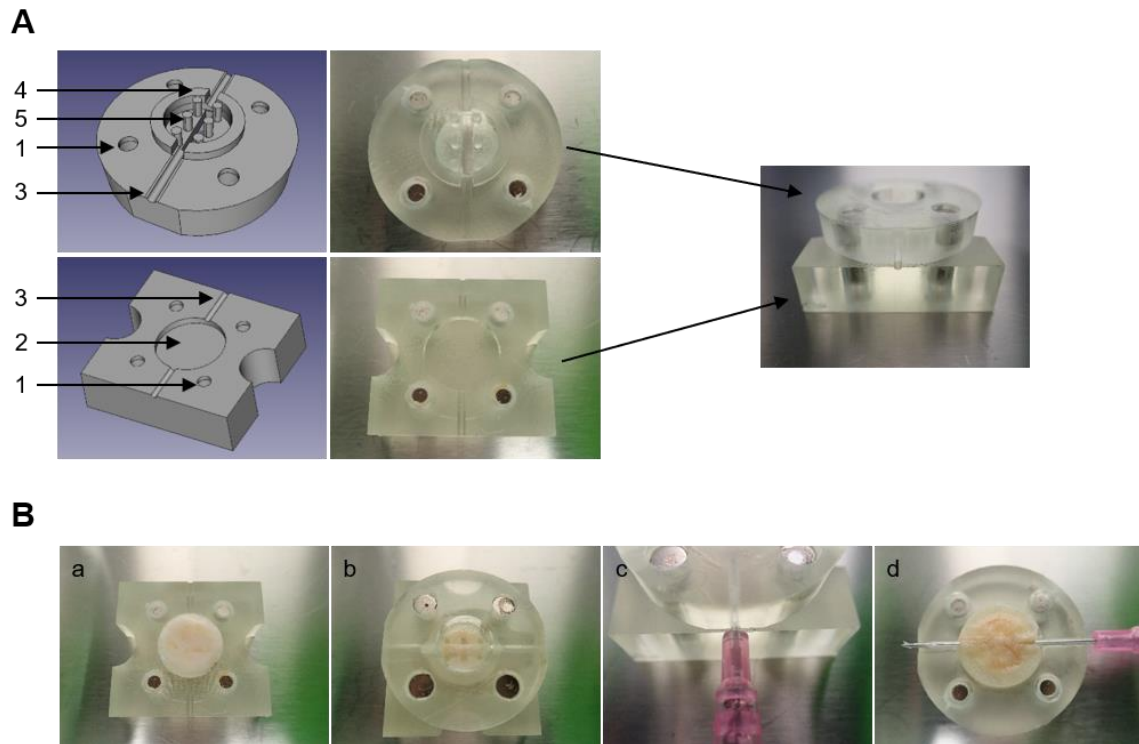


Figure 32. Présentation de la deuxième technique d'implantation. (A) Cette technique nécessite l'utilisation d'un outil de guidage imprimé en 3D par stéréolithographie dans une résine photosensible à partir d'un dessin 3D réalisé sur le logiciel FreeCad. L'outil est composé de deux pièces, qui se fixent grâce à des aimants (1). Dans la pièce inférieure, un emplacement est prévu au centre pour la biopsie (2). Des fentes sont placées dans chacune des deux pièces pour permettre le passage du cathéter (3). Dans la pièce supérieure, une couronne (4) et des ergots (5) permettent de maintenir la biopsie en place lors de l'implantation. **(B)** La biopsie de peau est déposée dans son emplacement, épiderme contre la pièce inférieure (a). La pièce supérieure est aimantée sur la pièce inférieure, emprisonnant la biopsie (b). Le cathéter est inséré dans l'empreinte prévue à cet effet, jusqu'à ce que la partie rose butte contre l'outil (c). Les deux pièces sont séparées pour libérer la biopsie, puis l'aiguille du cathéter est retirée (d).

Cet outil permet une implantation du dispositif très simple (**Figure 32.B**) : la biopsie est placée face épiderme vers le bas dans la pièce inférieure. La pièce supérieure est aimantée, emprisonnant ainsi la biopsie. Le cathéter est alors inséré dans le guide prévu à cet effet, jusqu'à ce qu'il arrive en butée contre la pièce. Les deux pièces sont séparées pour libérer la biopsie, puis l'aiguille est retirée, ne laissant que la tubulure plastique du cathéter en place. Ainsi, le cathéter est parfaitement centré dans l'explant, et l'implantation est toujours réalisée à la même profondeur dans le derme.

L'utilisation de l'outil de guidage imprimé en 3D permet une implantation du cathéter reproductible et contrôlée. Cependant, cette technique n'est pas adaptée à toutes les cas de figure : si la peau est trop épaisse (plus de 3 mm d'épaisseur), si l'on souhaite conserver la couche d'hypoderme ou bien si un composé est injecté au sein du modèle de peau avant l'implantation du cathéter. Ces deux techniques d'implantation peuvent donc être utilisées, selon l'application envisagée.

3. Evaluation de l'impact de l'implantation prolongée du cathéter non perfusé sur la physiologie de la peau

Le cathéter veineux périphérique implanté dans l'explant de peau est traditionnellement utilisé en clinique pour de la perfusion. Il est donc validé pour une implantation dans le corps humain sur plusieurs jours. Cependant, dans le cadre notre projet, le cathéter est implanté directement dans le derme et non dans une veine, et les applications envisagées pour le modèle perfusé nécessitent sa maintenance en culture durant sept à quatorze jours. Il est donc nécessaire d'évaluer l'impact de l'implantation prolongée du cathéter dans le derme sur la physiologie des modèles de peau.

Pour cela, des modèles NativeSkin® dans lesquels un cathéter a été implanté tel que décrit précédemment ont été cultivés durant sept jours. L'expérience a été réalisée en duplicat, sur trois donneurs indépendants. A l'issue des sept jours de culture, différentes analyses histologiques ont été réalisées :

- L'évaluation de la structure et de l'intégrité de la peau à l'aide d'une coloration à l'Hématoxyline et à l'Eosine,
- L'évaluation de la prolifération cellulaire grâce à un immunomarquage anti-Ki67,
- L'évaluation de l'apoptose des cellules grâce à un immunomarquage anti-Caspase-3 active.

Pour chacun de ces paramètres, les résultats obtenus sur un réplicat représentatif sont présentés pour chaque donneur, pour chacune des deux couches de la peau (épiderme et derme) et en deux zones distinctes : la périphérie de l'explant et le centre du modèle, au niveau de la zone d'implantation du cathéter. Les résultats sont comparés avec ceux obtenus pour des modèles NativeSkin® standards utilisés comme contrôles.

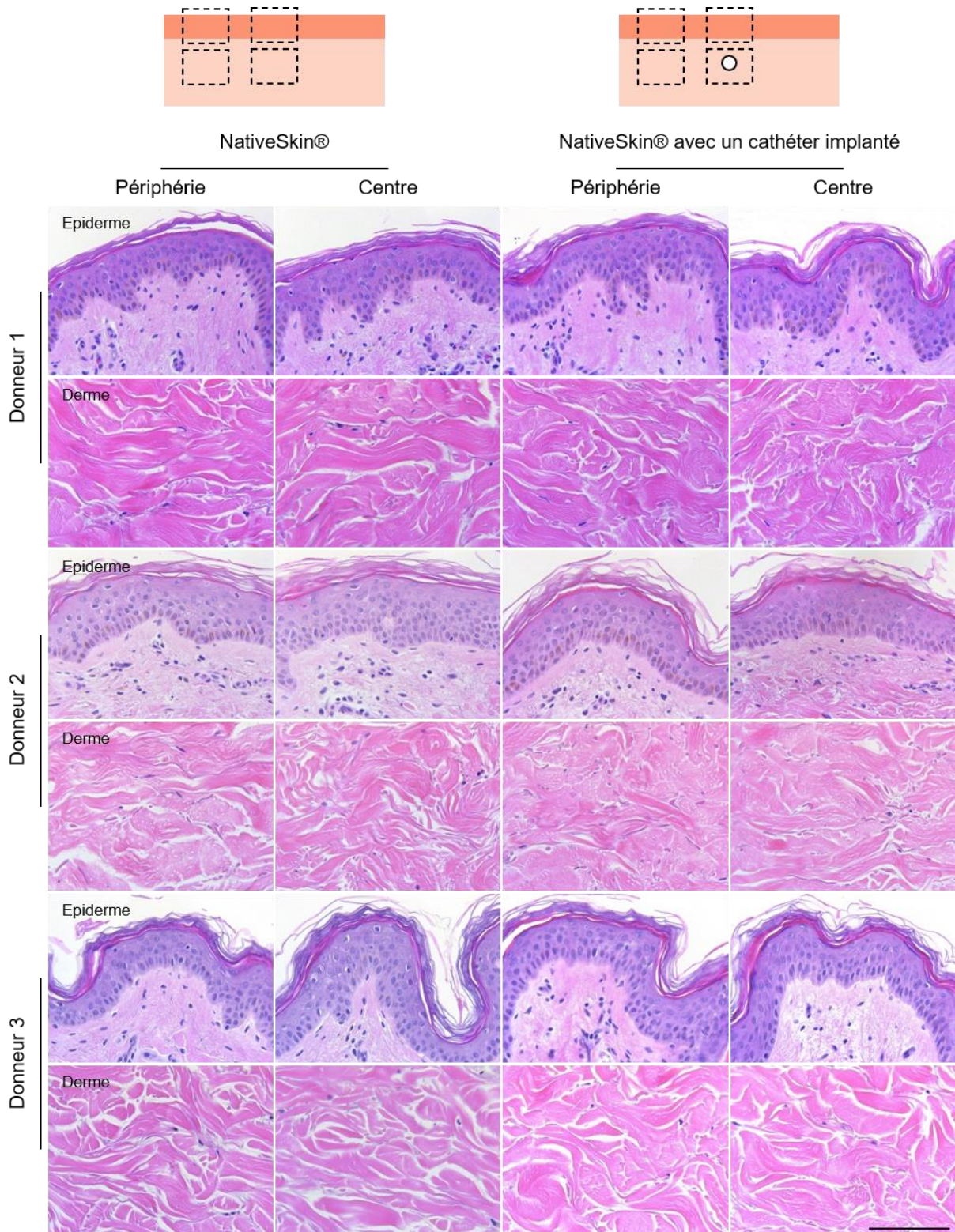


Figure 33. Evaluation de l'impact de l'implantation prolongée d'un cathéter non perfusé sur l'intégrité de la peau. Des modèles NativeSkin® de 15 mm de diamètre ont été cultivés pendant 7 jours, avec ou sans cathéter implanté dans le derme. L'expérience a été réalisée en duplicat sur trois donneurs indépendants. A l'issue de la culture, les modèles ont été fixés en formaline et inclus en paraffine. Une coloration Hématoxyline et Eosine a été réalisée sur des coupes de 5 µm d'épaisseur. Une photo représentative de l'épiderme et du derme est présentée pour chaque condition et pour chaque donneur, en deux zones différentes : à la périphérie de la biopsie, et au centre de la biopsie, au niveau du cathéter. Barre d'échelle : 100 µm.

3.1 Impact de l'implantation prolongée du cathéter sur l'intégrité de la peau

Les colorations Hématoxyline et Eosine réalisées sur les coupes des modèles NativeSkin® après sept jours de culture révèlent une structure de la peau normale (**Figure 33**). Au niveau de l'épiderme, les kératinocytes sont disposés en quatre couches : la couche basale, la couche épineuse, la couche granuleuse et la couche cornée. Les cellules sont cohésives, leurs noyaux ont une coloration violette prononcée et les cytoplasmes sont visibles et homogènes. Au niveau du derme, les fibres de collagène sont disposées en trousseaux. On distingue aussi la présence de fibres élastiques et de fibroblastes. Aucune différence notable dans la structure et dans la répartition des cellules n'est visible entre la périphérie des modèles et le centre des modèles.

Des résultats similaires sont observés pour les modèles NativeSkin® dans lesquels un cathéter est implanté, suggérant que l'implantation prolongée du cathéter n'a pas d'impact négatif sur la structure et l'intégrité de l'explant de peau.

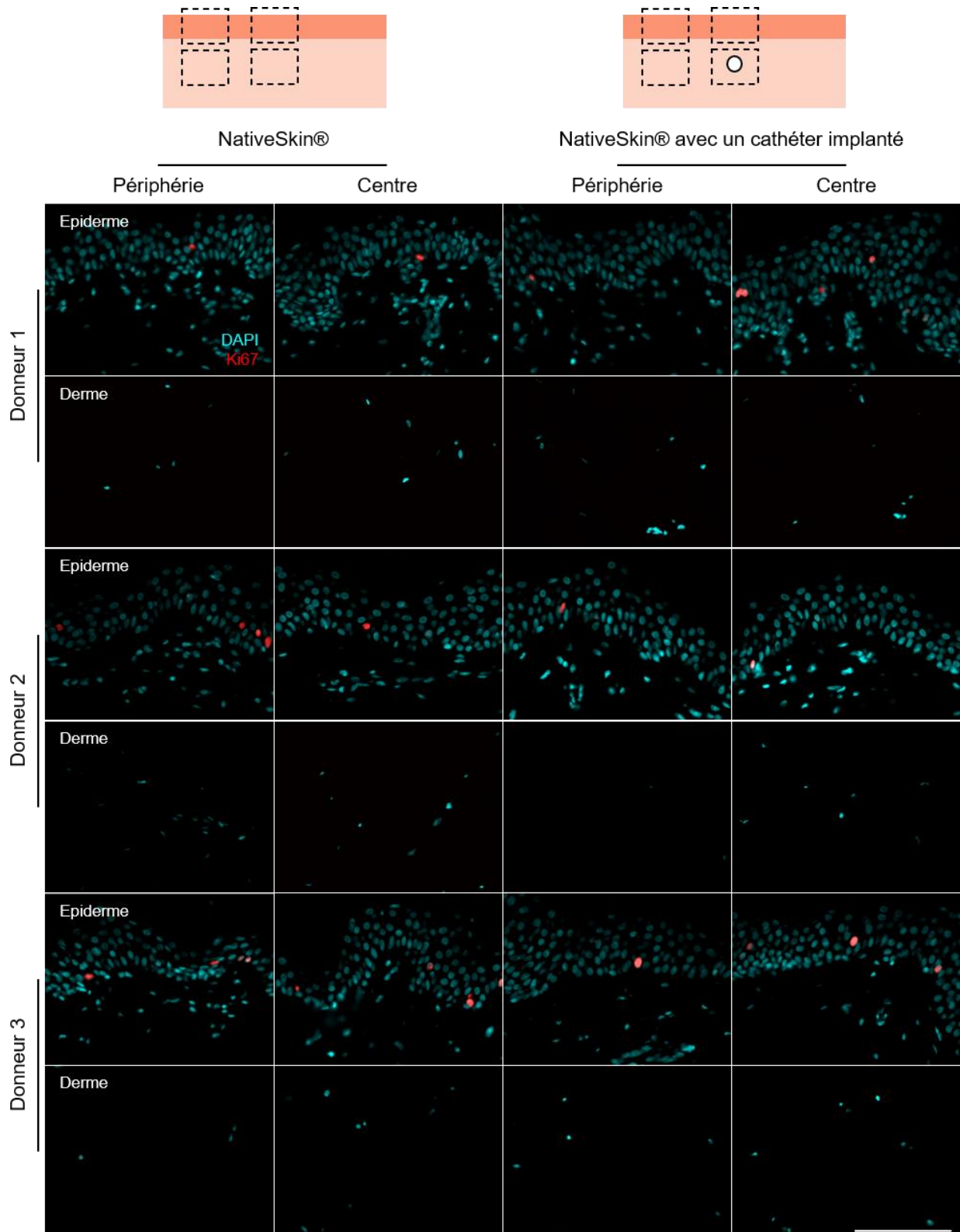


Figure 34. Evaluation de l'impact de l'implantation prolongée d'un cathéter non perfusé sur la prolifération cellulaire. Des modèles NativeSkin® ont été cultivés pendant 7 jours, avec ou sans cathéter implanté dans le derme. L'expérience a été réalisée en duplicat sur trois donneurs indépendants. A l'issue de la culture, les modèles ont été fixés en formaldéhyde et inclus en paraffine. Un immunomarquage anti-Ki67 a été réalisé sur des coupes de 5 µm d'épaisseur. Une photo représentative de l'épiderme et du derme est présentée pour chaque condition et pour chaque donneur, en deux zones différentes : à la périphérie de la biopsie, et au centre de la biopsie, au niveau du cathéter. Barre d'échelle : 100 µm.

3.2 Impact de l'implantation prolongée du cathéter sur la prolifération cellulaire

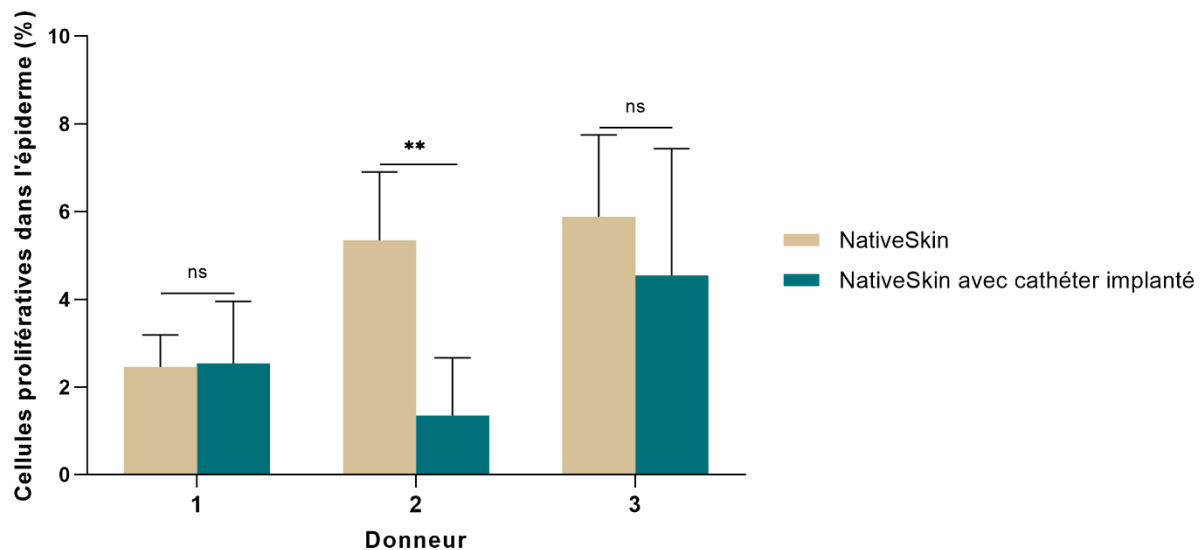


Figure 35. Quantification de l'impact de l'implantation prolongée d'un cathéter non perfusé sur la prolifération cellulaire. Des modèles NativeSkin® ont été cultivés pendant 7 jours, avec ou sans cathéter implanté dans le derme. L'expérience a été réalisée en duplicat sur trois donneurs indépendants. A l'issue de la culture, les modèles ont été fixés en formaline et inclus en paraffine. Un immunomarquage anti-Ki67 a été réalisé sur des coupes de 5µm d'épaisseur. Une quantification du pourcentage de cellules prolifératives dans l'épiderme a été réalisée sur 6 champs pour chaque répliat. Le graphique présente la moyenne et l'écart-type des valeurs obtenues pour chaque condition et pour chaque donneur. Un test statistique de Mann-Whitney a été réalisé. ns : $p > 0,05$; * : $p \leq 0,05$; ** : $p \leq 0,01$; *** : $p \leq 0,001$.

Les résultats de l'immunomarquage réalisé sur les coupes des modèles NativeSkin® après sept jours de culture révèlent qu'environ 2 à 6% des cellules de l'épiderme expriment le marqueur de prolifération Ki67 (**Figure 35**). Ces cellules semblent être présentes majoritairement dans la couche basale de l'épiderme (**Figure 34**). En revanche, aucune cellule marquée n'est visible dans le derme des explants de peau. De plus, aucune différence notable n'est visible entre la périphérie des modèles et le centre des modèles.

Des résultats similaires sont observés pour les modèles NativeSkin® dans lesquels un cathéter est implanté. Cependant, le pourcentage de cellules de l'épiderme exprimant le marqueur de prolifération Ki67 est statistiquement plus faible pour cette condition - en comparaison avec le modèle NativeSkin® standard - pour le deuxième donneur (**Figure 35**). Cette diminution de la prolifération semble particulièrement visible au centre de l'explant de peau, au niveau de la zone d'implantation du cathéter (**Figure 36**).

L'implantation prolongée d'un cathéter dans le derme des modèles de peau ne semble donc pas avoir d'impact négatif sur la prolifération cellulaire, à l'exception d'un donneur pour lequel une légère diminution de la prolifération est visible notamment au centre des modèles, au niveau de la zone d'implantation du cathéter.

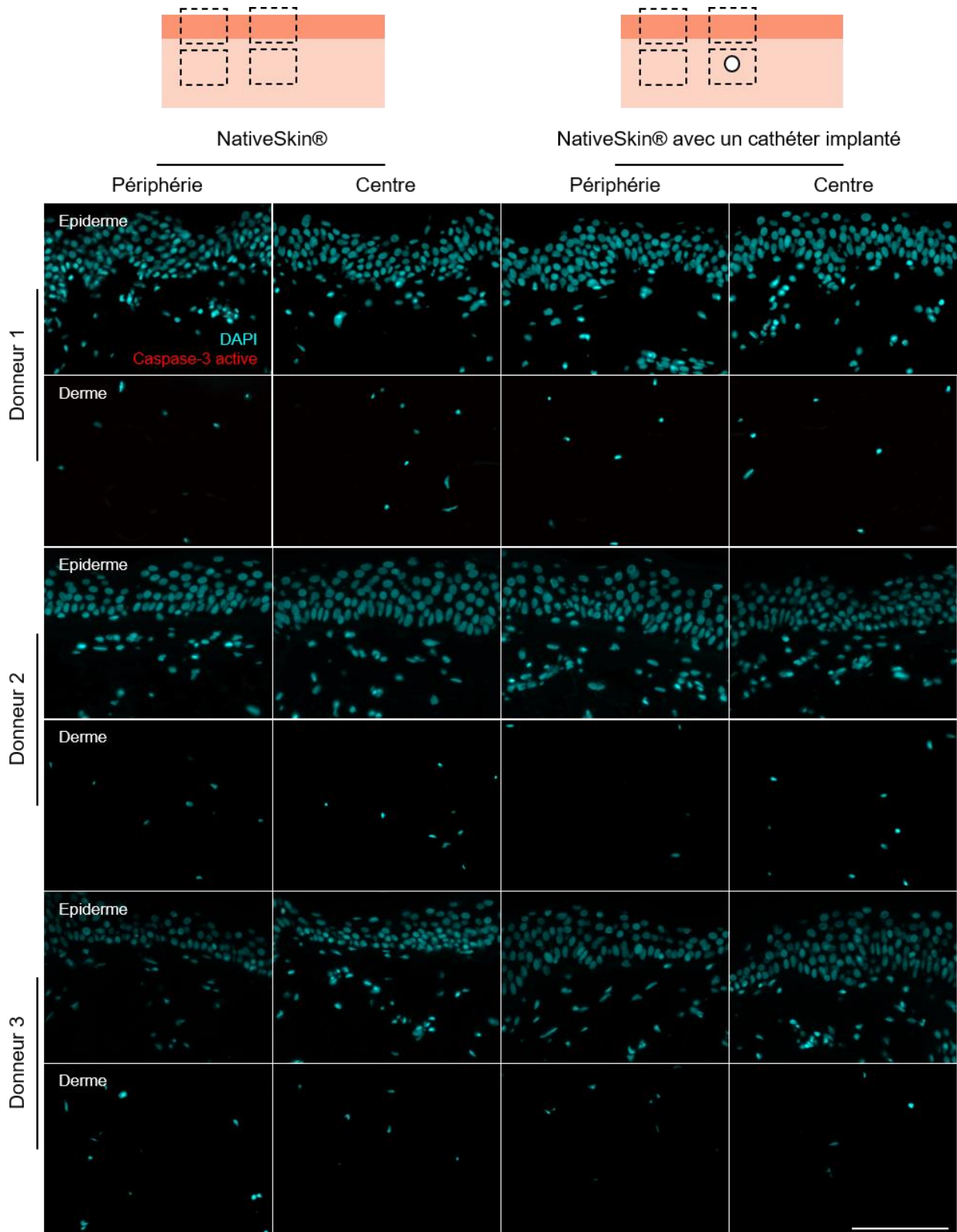


Figure 36. Evaluation de l'impact de l'implantation prolongée d'un cathéter non perfusé sur la mort cellulaire. Des modèles NativeSkin® ont été cultivés pendant 7 jours, avec ou sans cathéter implanté dans le derme. L'expérience a été réalisée en duplicat sur trois donneurs indépendants. A l'issue de la culture, les modèles ont été fixés en formaline et inclus en paraffine. Un immunomarquage anti-Caspase-3 a été réalisé sur des coupes de 5 µm d'épaisseur. Une photo représentative de l'épiderme et du derme est présentée pour chaque condition et pour chaque donneur, en deux zones différentes : à la périphérie de la biopsie, et au centre de la biopsie, au niveau du cathéter. Barre d'échelle : 100 µm.

3.3 Impact de l'implantation prolongée du cathéter sur la mort cellulaire

Les résultats de l'immunomarquage réalisé sur les coupes des modèles NativeSkin® après sept jours de culture révèlent qu'aucune cellule de l'épiderme ou du derme ne semble être positive à la Caspase-3 active, suggérant qu'aucune cellule n'est en apoptose, que ce soit au centre des explants de peau ou à la périphérie (**Figure 36**). L'immunomarquage réalisé sur une coupe d'un contrôle positif a révélé un signal positif à la Caspase-3 active.

Des résultats similaires sont observés pour les modèles dans lesquels un cathéter est implanté, suggérant que l'implantation prolongée du cathéter n'a pas incidence significative sur l'apoptose cellulaire.

L'ensemble de ces résultats suggère que l'implantation d'un cathéter dans le derme des modèles de peau pendant sept jours n'a qu'un impact modéré sur la physiologie des modèles de peau, que ce soit au niveau de la structure histologique du tissu, de la prolifération cellulaire ou bien de la viabilité des cellules. Les cathéters veineux périphériques utilisés semblent donc adaptés à une implantation prolongée dans le derme des modèles de peau, malgré leur diamètre externe important et la déformation de l'explant de peau qu'ils engendrent (Figure 37).

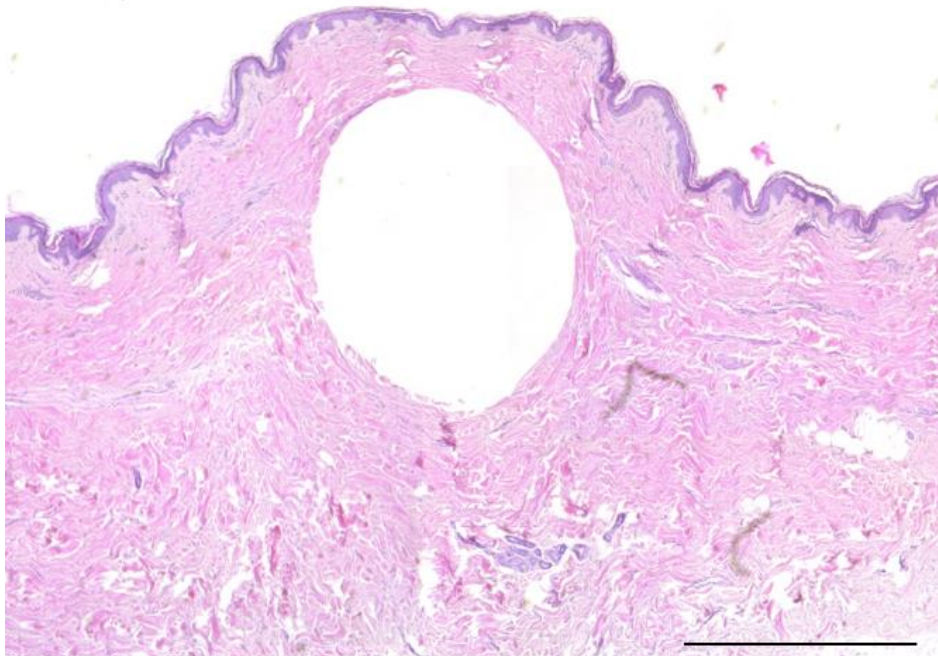


Figure 37. Coupe d'un modèle de peau dans lequel un cathéter a été implanté. Un cathéter a été implanté dans une biopsie de peau de 15 mm de diamètre. La biopsie a immédiatement été fixée en formaline et incluse en paraffine. Une coloration Hématoxyline et Eosine a été réalisée sur une coupe de 5 µm d'épaisseur. Barre d'échelle : 1 mm.

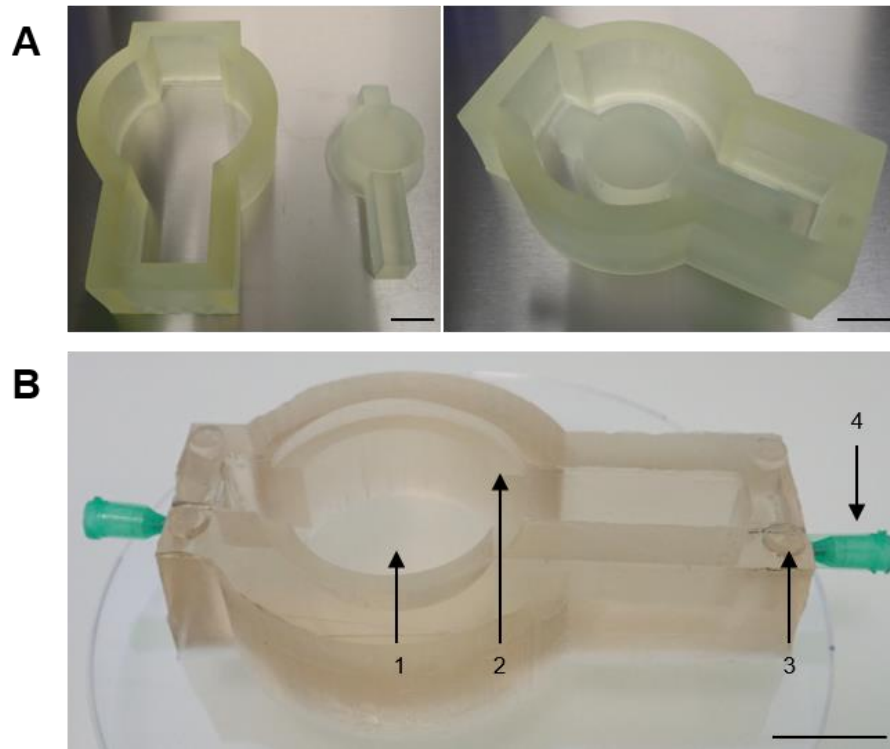


Figure 38. Présentation des supports de culture fabriqués pour la perfusion des modèles de peau. (A) Deux pièces ont été imprimées en 3D par stéréolithographie dans une résine photosensible. Ces deux pièces sont complémentaires et servent de moule pour la fabrication de supports de culture. Du PDMS est coulé entre les deux pièces. (B) Après démoulage, la plaque obtenue est traitée avec de la BSA à 4,5 g/L en PBS. Ce type de plaque peut être réutilisé après autoclavage. Un puits est destiné à recevoir du milieu de culture (1). Un emplacement est prévu pour servir de support à des inserts de culture standards (2). Des disques de PDMS ont été collés sur les quatre coins de la plaque, afin de pouvoir la fermer à l'aide d'un couvercle (3). Enfin, des aiguilles ont été placées dans les parois de la plaque, afin de relier le modèle au système microfluidique (4).

4. Adaptation des consommables de culture cellulaire pour la culture d'un modèle de peau *ex vivo* perfusé

Le modèle de peau *ex vivo* NativeSkin®, commercialisé par Genoskin, est maintenu en culture dans des consommables de culture cellulaire traditionnels tels que des inserts de culture et des plaques de 6, 12 ou 24 puits, selon le diamètre de la biopsie utilisée.

Dans le cas d'un modèle perfusé, des contraintes liées au passage du dispositif microporeux et des tubes microfluidiques doivent être prises en compte, et les consommables de culture cellulaire adaptés en conséquence.

4.1 Création de supports de culture en PDMS

Afin de permettre le passage du dispositif microporeux et des tubes microfluidiques nécessaire à la perfusion du modèle de peau, des supports de culture ont été créés.

Le PolyDiMéthylSiloxane (PDMS) a été choisi comme matériau de fabrication pour sa biocompatibilité, son faible coût, sa perméabilité aux gaz, sa facilité d'utilisation et sa déformabilité, permettant la connexion étanche de connecteurs microfluidiques. La création des supports en PDMS a nécessité la fabrication d'un moule imprimé en trois dimensions dans une résine, la DS3000 (**Figure 38.A**). Le PDMS est coulé entre les deux pièces du moule, puis démoulé après réticulation. Le support ainsi obtenu possède les caractéristiques classiques d'une plaque de culture à savoir un puits dans lequel le milieu de culture est déposé, un emplacement servant de support à un insert de culture, ainsi que la possibilité d'être fermé par un couvercle. En outre, des aiguilles peuvent être insérées de manière étanche dans les parois de la plaque afin de connecter le modèle de peau perfusé au reste du système microfluidique (**Figure 38.B**). Les supports de culture sont traités avec de la BSA afin d'éviter l'adsorption de composés du milieu de culture qui entrainerait une modification éventuelle de la composition de ce dernier. Elles peuvent être réutilisées plusieurs fois après autoclavage.

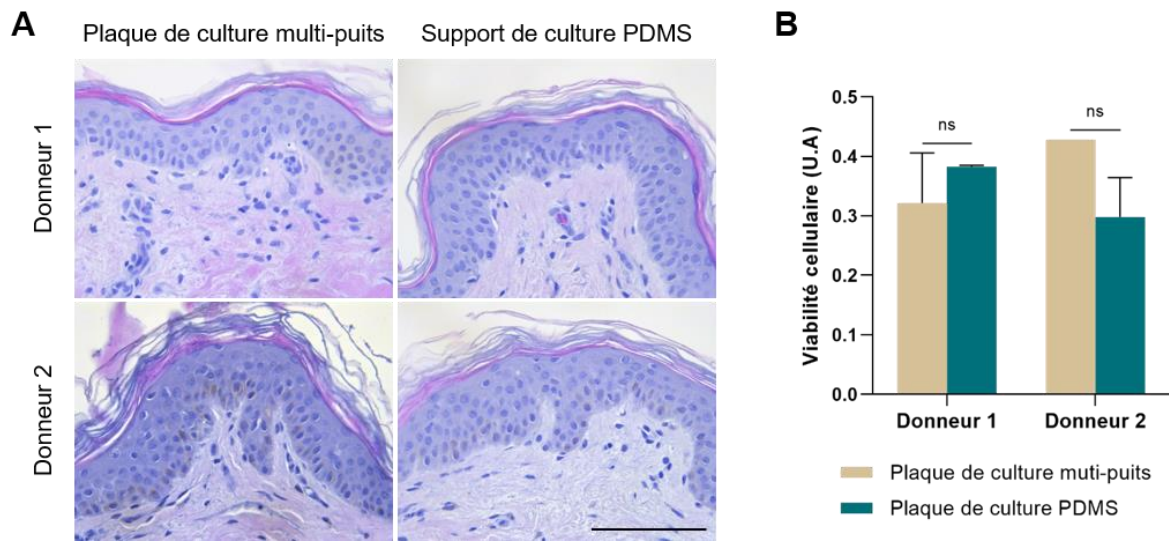


Figure 39. Evaluation de l'impact de la culture dans des supports en PDMS sur l'intégrité et la viabilité des modèles de peau. Des modèles NativeSkin® ont été cultivés pendant 7 jours dans des plaques de culture multi-puits ou dans des supports de culture en PDMS. L'expérience a été réalisée sur deux donneurs indépendants. A l'issue de la culture, les modèles ont été coupés en deux. **(A)** Une moitié a été fixée en formaline et incluse en paraffine. Une coloration Hématoxyline et Eosine a été réalisée sur des coupes de 5 µm d'épaisseur. Une photo représentative de l'épiderme est présentée pour chaque condition et pour chaque donneur. Barre d'échelle : 100 µm. **(B)** Deux biopsies de 2 mm de diamètre ont été produites dans l'autre moitié. Un test de viabilité au WST-8 a été réalisé à partir de ces biopsies fraîches. Le graphe présente la moyenne et l'écart-type de la viabilité des deux réplicats, pour chaque condition et pour chaque donneur. Un test statistique de Mann-Whitney a été réalisé. ns : p > 0,05 ; * : p ≤ 0,05 ; ** : p ≤ 0,01 ; *** : p ≤ 0,001.

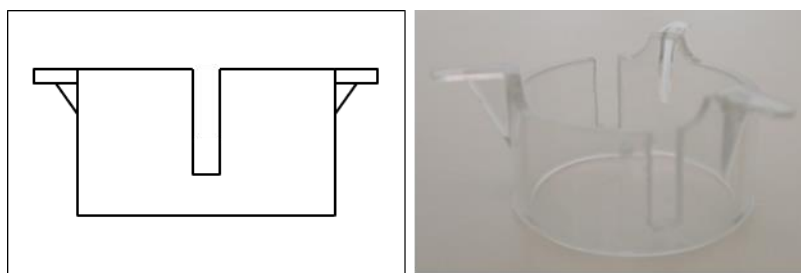


Figure 40. Adaptation des inserts de culture pour la perfusion des modèles de peau. Afin de permettre le passage du cathéter et des tubes microfluidique, des inserts de culture standards ont dû être modifiés : deux fentes ont été créées dans leur paroi à l'aide d'une scie. Barre d'échelle : 1 mm.

Afin d'évaluer l'impact de la culture dans des supports en PDMS sur l'intégrité et la viabilité des modèles de peau, et de valider leur utilisation pour la culture des modèles FlowSkin, des modèles NativeSkin® ont été maintenus en culture pendant 7 jours dans des plaques de culture multipuits classiques ou dans des supports en PDMS. L'expérience a été réalisée sur deux donneurs indépendants.

A l'issue des 7 jours de culture, la morphologie du tissu a été évaluée sur des coupes colorées à l'Hématoxyline et à l'Éosine (**Figure 39.A**). Les résultats montrent une histoarchitecture normale que ce soit pour les modèles cultivés en plaques multipuits ou pour ceux cultivés en plaques PDMS. La viabilité cellulaire a également été mesurée par un test colorimétrique au WST-8 (**Figure 39.B**). Les résultats ne montrent pas de différence statistiquement significative entre la viabilité cellulaire des modèles cultivés en plaques multipuits et celle des modèles cultivés dans les supports en PDMS.

Les supports de culture en PDMS développés ne semblent donc pas avoir d'impact négatif sur l'intégrité et la viabilité de la peau et semblent adaptés à la culture des modèles de peau perfusés.

4.2 Modification des inserts de culture

Les inserts de culture utilisés ont également dû être modifiés pour permettre le passage du cathéter. Des fentes ont été créées dans leur paroi à l'aide d'une scie (**Figure 40**). Ces fentes ne doivent pas être trop larges ni trop profondes afin que la matrice ne s'écoule pas hors de l'insert avant sa solidification.

5. Présentation des différentes pompes testées

La mise en place d'un flux de liquide au sein du modèle de peau nécessite l'utilisation d'un moyen de propulsion. Trois types de pompes ont été testées au cours de ce projet : une pompe péristaltique, une pompe à régulation de pression et un pousse-seringue.

5.1 Pompe péristaltique

Dans un premier temps, une pompe péristaltique a été testée : le modèle EP-1 Econo™ Pump (Bio-Rad). Le principe de cette pompe est basé sur la compression d'un tube souple contenant le fluide, engendrée par la rotation de galets. L'avantage de cette pompe est qu'elle est très simple d'utilisation.

En revanche, ce type de pompe propose typiquement des plages de débits, allant de 10 µL/min à 20 mL/min ce qui ne permet de contrôler avec précision la gamme de débits qui sera utilisée dans ces travaux (inférieurs à 10 µL/min). De plus, un effet pulsatile est généralement observé avec ce type de pompe. Enfin, seulement deux modèles de peau peuvent être perfusés à la fois, ce qui la rend relativement encombrante et peu adaptée à la parallélisation.

5.2 Pompe à régulation de pression

Le deuxième type de pompe testé est un régulateur de pression. Les tests effectués ont été basés sur les systèmes MFCS™-EZ (Fluigent). Le réservoir contenant le fluide à perfuser est mis sous pression par injection d'air comprimé, entraînant la propulsion du liquide dans le capillaire plongé dans le réservoir. Le fluide passe ensuite dans un débitmètre. La pression du réservoir est automatiquement régulée par une boucle de rétroaction contrôlée par un algorithme, afin d'atteindre le débit souhaité et de le maintenir constant tout au long de la culture. Cette pompe permet d'atteindre de faibles débits, de l'ordre du nanolitre par minute.

Malgré de nombreux tests et optimisations, cette pompe ne s'est pas avérée adaptée à la perfusion des explants. En effet, la peau étant un tissu complexe et en constante évolution au cours de temps, il est donc difficile de garantir une calibration fiable du système et une fluctuation importante des débits imposés a été observée de façon répétée. Du fait de ce manque de reproductibilité, il n'a pas été possible d'utiliser ce régulateur de pression sur des temps longs.

5.3 Pousse-seringue

Pour finir, le troisième type de pompe testé est un pousse-seringue. Le système utilisé est le modèle neMESYS (Cetoni). Son principe repose sur l'actionnement motorisé du piston d'une seringue contenant le fluide à perfuser. Le pousse-seringue est très simple d'utilisation et permet de maintenir des débits précis, constants et contrôlés par une interface logicielle. Une large plage de débits est possible, allant de 0,006 nL/min à 152,6 mL/min. La vitesse de déplacement du piston est contrôlée avec une résolution de l'ordre du nm/s ce qui permet de limiter les effets pulsatiles induits par le mécanisme de déplacement et les instabilités liés au frottement du piston au sein de la seringue. Il est également possible d'ajouter une vanne afin de passer du remplissage de la seringue dans un réservoir à la perfusion du liquide de façon automatique, sans avoir à toucher à la seringue ou aux tubes. Enfin, il est possible avec la même unité de contrôle de piloter en parallèle jusqu'à 8 modules indépendants permettant ainsi de paralléliser les études et de réduire l'encombrement de l'instrument. Des cycles de perfusion peuvent être programmés, ce qui permet une autonomie complète sur des longs temps de culture.

Le pousse-seringue neMESYS (Cetoni) a donc été choisi comme type de pompe pour la perfusion du modèle FlowSkin, d'une part du fait de la précision et de la fiabilité des débits qu'il permet d'atteindre, et d'autre part pour son faible encombrement et sa complète autonomie, permettant d'envisager la mise en place d'une plateforme de perfusion de modèles de peau *ex vivo* à plus grande échelle.

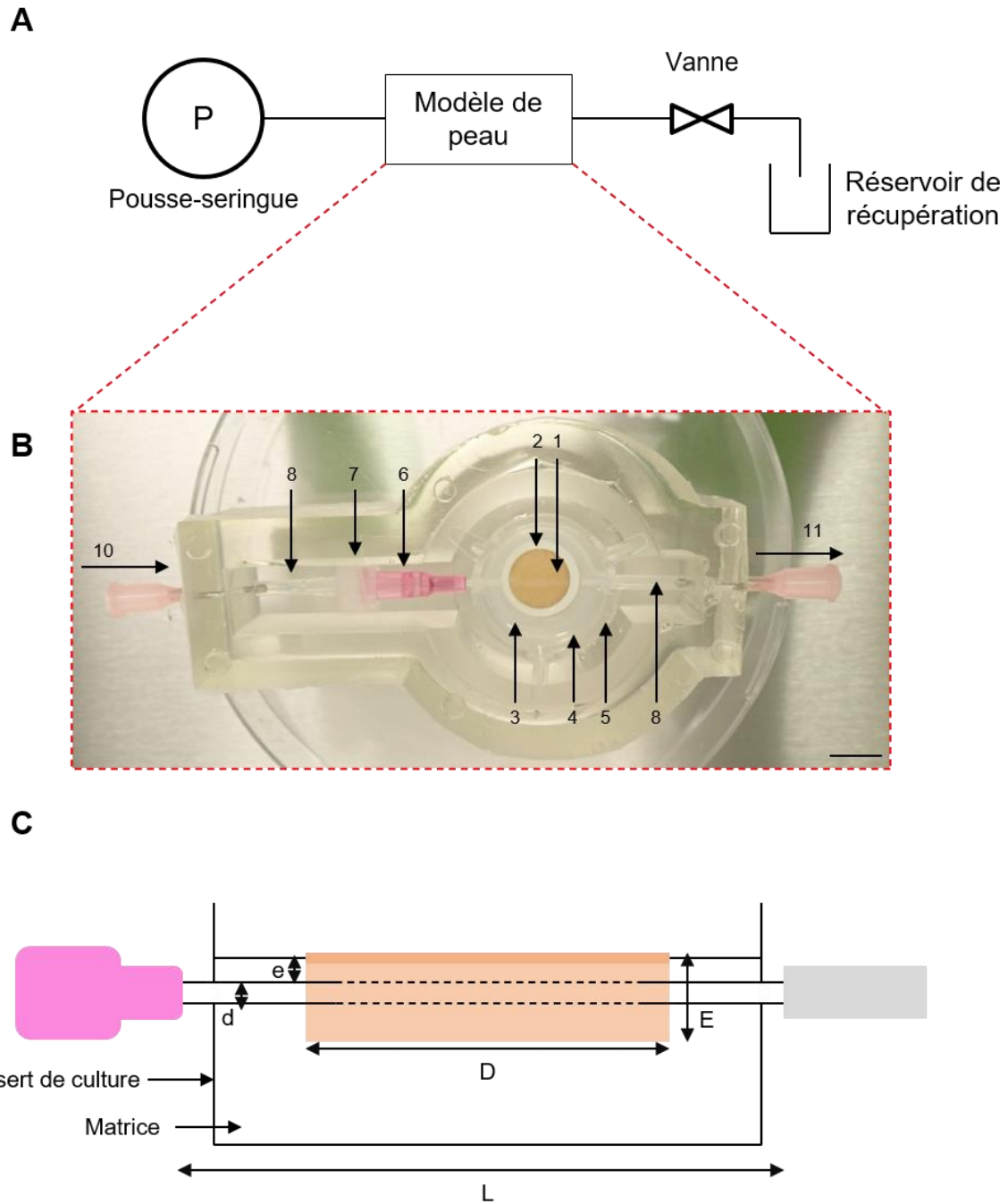


Figure 41. Présentation du système FlowSkin. (A) Le système FlowSkin est composé d'un pousse-seringue, permettant la perfusion intra-tissulaire d'un modèle *ex vivo* de peau humaine. Une vanne est placée en aval du modèle de peau, permettant de réguler la pression à l'intérieur du cathéter en ouvrant ou en fermant la sortie du dispositif microporeux. Enfin, un réservoir placé en sortie du système permet de récupérer le flux sortant. (B) Vue zoomée sur le modèle de peau dans son support de culture en PDMS. Le modèle FlowSkin est constitué d'une biopsie de peau humaine fraîche de 15 mm de diamètre (1), sur laquelle est collé un œillet en silicone (2). La biopsie est maintenue dans une matrice semi-solide (3) dans un insert de culture (4). Du milieu de culture est placé dans le puits sous l'insert (5). Un cathéter microporeux est implanté dans le derme de la biopsie de peau (6) et relié au reste du système microfluidique grâce à des connecteurs (7) et à des tubes microfluidiques (8). Le flux rentre en amont du modèle de peau (10) et ressort en aval du modèle de peau (11). Barre d'échelle : 1 cm. (C) Représentation schématique du modèle de peau perfusé (le schéma n'est pas à l'échelle). D (diamètre de la biopsie) = 15 mm. L (longueur du cathéter) = 32 mm. E (épaisseur totale de la biopsie) = environ 3 mm. D (diamètre externe du cathéter) = 1,1 mm. e (profondeur d'implantation du cathéter par rapport à l'épiderme) = environ 500 µm.

6. Le modèle FlowSkin

Le modèle FlowSkin ainsi obtenu (**Figure 41**) est composé d'une biopsie de peau humaine fraîche, dans laquelle un cathéter possédant des pores de 50 μm de diamètre en son centre est implanté. La biopsie est maintenue dans une matrice nourricière semi-solide. Un œillet en silicone est collé sur la surface de la biopsie, permettant de la maintenir en flottaison sur la matrice liquide avant qu'elle ne se solidifie. L'ensemble est contenu dans un insert de culture dont la surface inférieure est poreuse. Cet insert est placé dans le puits d'un support de culture spécialement développée en PDMS. Du milieu de culture est déposé dans le puits, et diffuse passivement dans la matrice et dans la biopsie de peau par la membrane poreuse de l'insert. Les deux extrémités du cathéter sont reliées à des aiguilles implantées de façon étanche dans les parois de la plaque, par le biais de tubes et de connecteurs microfluidiques. L'ensemble est fermé par un couvercle, et peut être placé dans un incubateur sous atmosphère contrôlée à 37°C, 5% de CO₂ et humidité maximale.

Le modèle est relié en amont à un pousse-seringue, permettant la propulsion du fluide à perfuser. Le modèle est relié en aval à une vanne, permettant de réguler la pression à l'intérieur du cathéter en ouvrant ou en fermant la sortie du cathéter. Un réservoir est placé en sortie du système microfluidique afin de récupérer le flux sortant.

Le système développé durant cette première partie permet de perfuser un liquide dans le derme d'un modèle *ex vivo* de peau humaine grâce à l'implantation d'un cathéter microporeux relié à un système microfluidique. Le modèle FlowSkin ainsi obtenu peut être maintenu en culture dans des conditions de culture classiques. Ce système a fait l'objet d'un dépôt de brevet (EP20186345.3).

Partie 2. Développement de méthodes d'analyse de la diffusion de composés dans des explants de peau humaine

Un des objectifs de la perfusion du modèle FlowSkin est l'administration de composés au sein du tissu. Il est donc nécessaire de pouvoir visualiser et/ou quantifier de façon dynamique la distribution spatiale et la concentration de ces composés dans la peau. En parallèle de la mise en place du flux intra-tissulaire, le deuxième objectif de mes travaux a donc consisté à développer différentes méthodes d'analyse de la diffusion de composés dans des explants de peau humaine.

Au cours de ce projet, quatre méthodes d'analyse ont été développées :

- L'évaluation macroscopique et qualitative de la diffusion à l'aide d'un colorant,
- L'évaluation de la diffusion en temps réel par radiographie à rayons X,
- L'évaluation de la diffusion en 3 dimensions par tomographie à rayons X,
- L'évaluation de la diffusion de dextrans fluorescents de différents poids moléculaires, sur coupes histologiques.

Un modèle numérique basé sur la méthode des éléments finis et permettant de simuler la diffusion dans le modèle de peau *ex vivo* a également été développé, afin de prédire le profil de diffusion d'un composé.

Ces méthodes ont tout d'abord été développés sur des modèles simples, telles que des biopsies en flottaison, ou le modèle NativeSkin®. Elles ont ensuite été transposées au modèle FlowSkin, afin de caractériser la diffusion des composés perfusés dans le tissu via le dispositif microporeux.

1. Evaluation macroscopique et qualitative de la diffusion d'un colorant

La première méthode d'analyse consiste à utiliser un colorant alimentaire, du bleu patenté V (E131), et à observer macroscopiquement sa diffusion à la surface de la peau. Cette technique, très simple à mettre en place et peu quantitative, permet toutefois d'obtenir facilement et rapidement de premières informations quant à la diffusion d'un composé dans la peau. Le colorant alimentaire utilisé a un poids moléculaire de 1160,45 g/mol. Les composants majoritaires du milieu de culture utilisé pour la maintenance des modèles de peau développés par Genoskin ont des poids moléculaires légèrement inférieurs, de l'ordre de 100 à 200 g/mol.

1.1 Diffusion du colorant dans une biopsie de peau en flottaison

La diffusion du colorant a tout d'abord été évaluée dans une biopsie de peau, placée en flottaison sur une solution de colorant à 0,5 % (poids/volume) dans du PBS pendant 24 heures. L'expérience a été réalisée en duplicats, sur trois donneurs indépendants. Les résultats obtenus pour une biopsie représentative de l'ensemble des donneurs sont présentés (**Figure 42**).

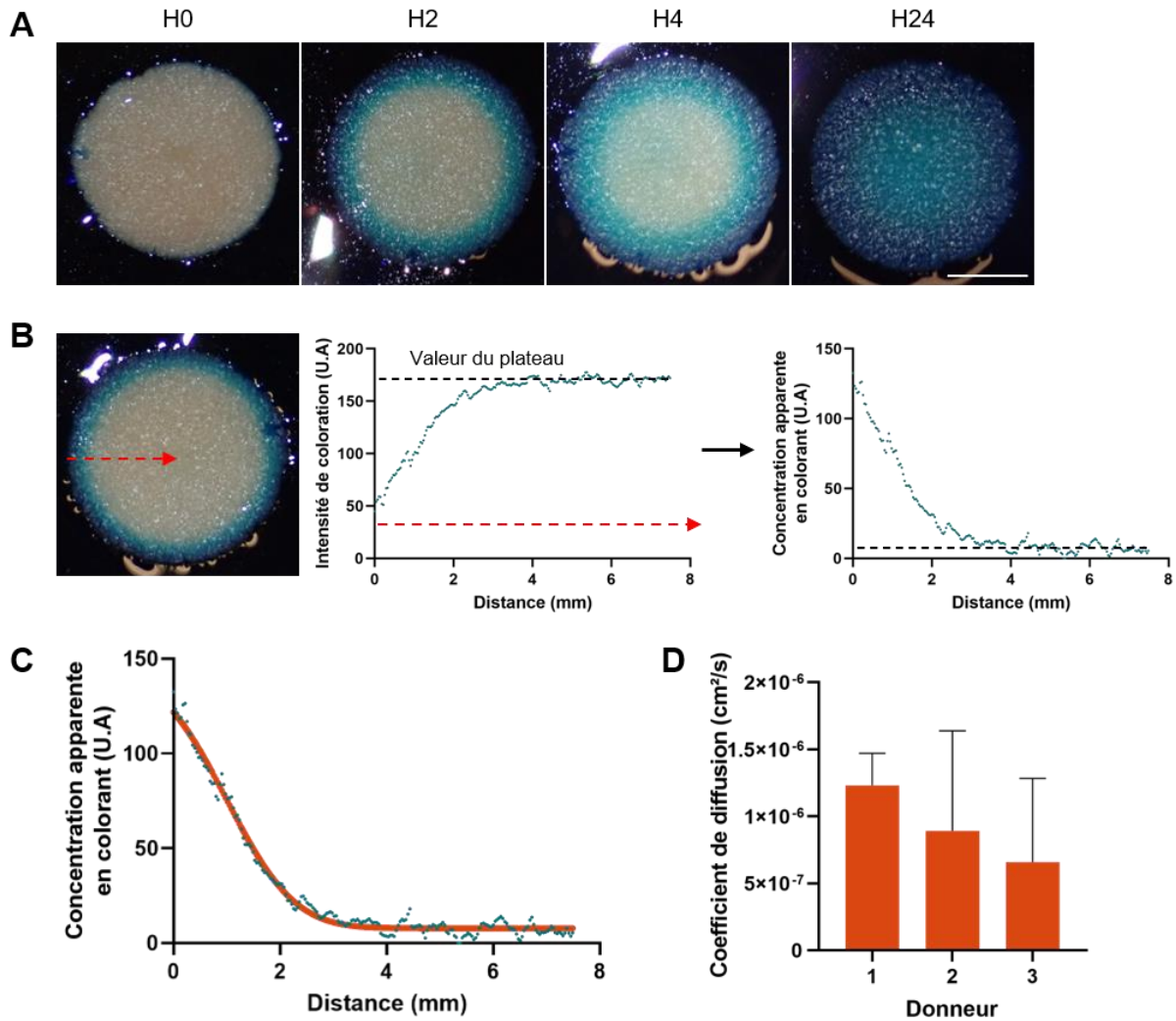


Figure 42. Détermination du coefficient de diffusion d'un colorant dans la peau. Des biopsies de 15 mm de diamètre ont été placées en flottaison sur du colorant alimentaire bleu à 0,5 % (poids/volume) dans du PBS. L'expérience a été réalisée en duplicat sur trois donneurs indépendants. **(A)** Analyse macroscopique de la diffusion du colorant à différents temps de cinétique. Un réplicat représentatif de l'ensemble des donneurs est présenté. Barre d'échelle : 5 mm. **(B)** Le profil d'intensité de coloration a été tracé suivant un axe allant du bord au centre de la biopsie (flèche en pointillés rouge). Le graphe obtenu après normalisation représente la concentration apparente en colorant dans la peau en fonction de la distance depuis le bord de la biopsie. Ce graphe est caractéristique de la loi de Fick. La méthode utilisée pour la normalisation du graphe est détaillée dans la partie Matériel & Méthodes de ce manuscrit (**Paragraphe 4.1.2.a**). **(C)** La fonction d'erreur est appliquée (en orange) afin de lisser les données expérimentales (en bleu). $R^2 = 0,98757$. **(D)** Grâce à la loi de Fick, le coefficient de diffusion du colorant dans la peau est calculé. Le graphe présente la moyenne et l'écart-type des coefficients de diffusion obtenus pour les trois donneurs.

L'évaluation macroscopique de la surface de la peau montre un front de diffusion clairement visible, qui s'étend progressivement du bord de la biopsie vers le centre de la biopsie au cours du temps. Après 24 heures, l'ensemble de la surface de la biopsie est coloré, mais de façon inhomogène (**Figure 42.A**).

Dans le but d'extraire des données quantitatives de ces expériences, un coefficient de diffusion du colorant dans la peau a été mesuré, en considérant que l'intensité de coloration à la surface de la peau peut être corrélée de façon linéaire à la concentration en colorant dans le tissu (**Figure 42.B et 42.C**). Dans cette expérience, la méthode utilisée pour extraire le coefficient de diffusion se doit d'être nuancée. En effet, les mesures proposées ne permettent pas de mesurer la distribution spatiale de la concentration en colorant dans le tissu et la valeur utilisée fait uniquement référence à la coloration de la surface de la peau, et non à celle dans toute la profondeur de la biopsie. La peau est ici considérée comme un matériau isotrope, et le coefficient calculé ne prend pas en compte les différences de densité, de porosité et de nature des différents compartiments de la peau, notamment entre l'épiderme et le derme. Notre ambition est de mesurer un coefficient de diffusion moyen, qui n'intègre cependant pas l'hétérogénéité du tissu.

De plus, dans le cas de la biopsie en flottaison, le flux de matière ne se fait pas seulement par les côtés de la biopsie, mais également par la surface inférieure du derme. Les mesures ont été réalisées sur des temps courts de culture (1 heure), afin de pouvoir négliger le flux de molécules depuis la surface inférieure et de ne considérer que la diffusion latérale en suivant un modèle de symétrie axiale. Cette hypothèse nous permet de considérer un front de diffusion vertical qui peut être associé à la distribution de colorant observée à la surface de l'échantillon. La méthode utilisée pour calculer ce coefficient est décrite dans la partie Matériel & Méthodes de ce manuscrit (**Paragraphe 4.1.2.b**).

Pour chaque donneur, la moyenne et l'écart-type des coefficients obtenus est présentée (**Figure 42.D**).

Dans le cas d'échantillons de peau en flottaison, le coefficient de diffusion moyen du colorant observé est de $9,3 \cdot 10^{-7} \pm 2,9 \cdot 10^{-7}$ cm²/s (mesure réalisée en duplicat sur trois donneurs indépendants).

1.2 Diffusion du colorant dans la matrice des modèles de peau

Les modèles de peau développés par Genoskin sont composés d'une biopsie de peau, maintenue dans une matrice semi-solide, dans un insert de culture. Le milieu de culture diffuse passivement à travers la membrane poreuse de l'insert, d'abord dans la matrice, puis dans la biopsie de peau. Afin de comprendre et d'analyser les mécanismes de transports de molécules qui ont lieu entre le milieu de culture et la peau, il est donc essentiel de caractériser la diffusion de molécules dans la matrice.

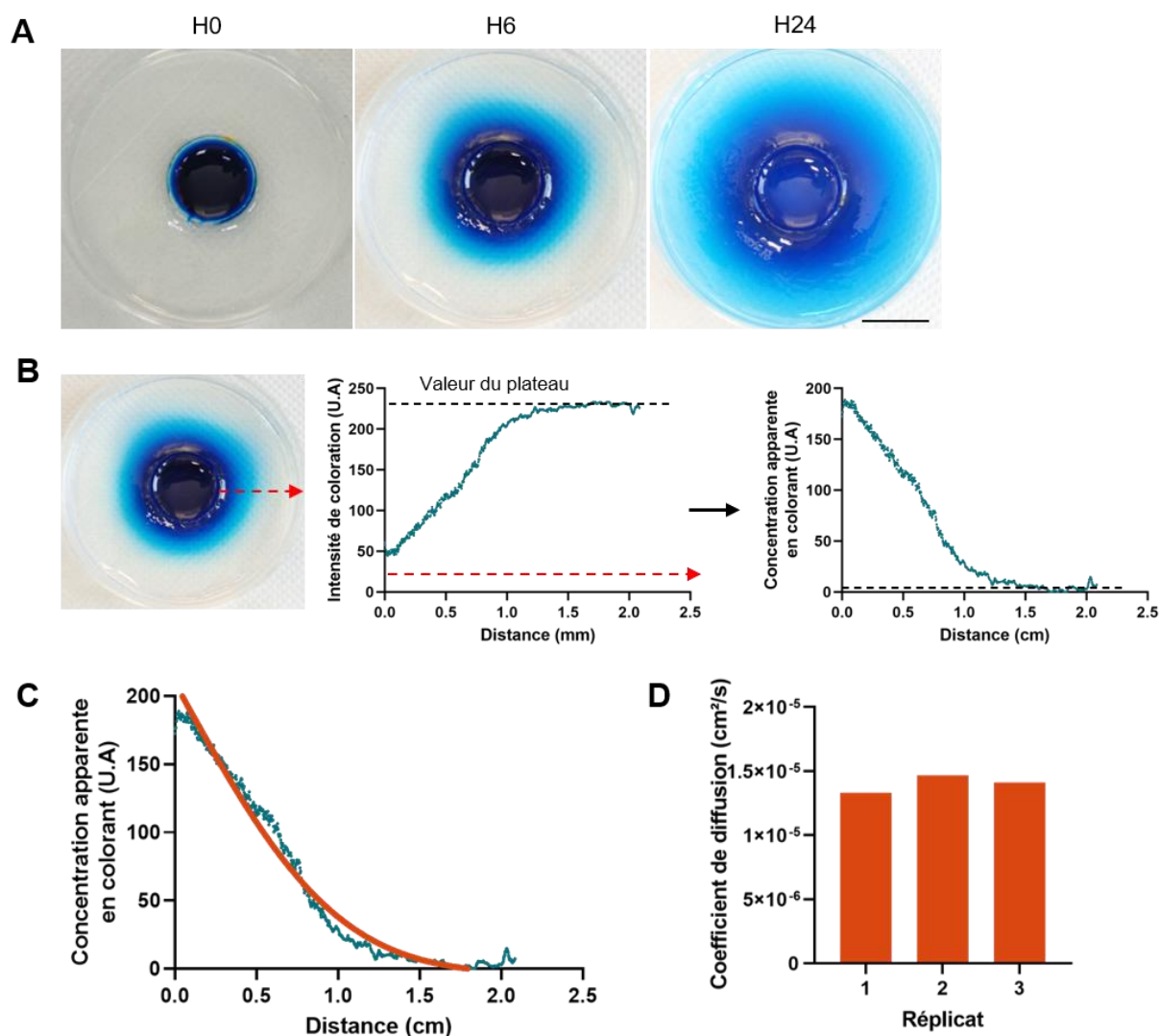


Figure 43. Détermination du coefficient de diffusion d'un colorant dans la matrice. De la matrice a été coulée dans des boîtes de Pétri et des puits de 12mm de diamètre ont été formés en leur centre. Du colorant alimentaire bleu à 0,5 % (poids/volume) dans du PBS a été déposé dans ces puits. L'expérience a été réalisée en triplicat. **(A)** Analyse macroscopique de la diffusion du colorant à différents temps de cinétique. Un réplicat représentatif est présenté. Barre d'échelle : 1 cm. **(B)** Le profil d'intensité de coloration a été tracé suivant un axe allant du bord du puits au bord de la boîte de Pétri (flèche en pointillés rouge). Le graphe obtenu après normalisation représente la concentration apparente en colorant dans la matrice en fonction de la distance depuis le bord du puits. Ce graphe est caractéristique de la loi de Fick. La méthode utilisée pour la normalisation du graphe est détaillée dans la partie Matériel & Méthodes de ce manuscrit (**Paragraphe 4.1.2.a**). **(C)** La fonction d'erreur est appliquée (en orange) afin de lisser les données expérimentales (en bleu). $R^2 = 0,98267$. **(D)** Grâce à la loi de Fick, le coefficient de diffusion du colorant dans la matrice est calculé. Le graphe présente les coefficients de diffusion obtenus pour les trois réplicats.

Pour ce faire, du colorant à 0,5 % (poids/volume) dans du PBS a été placé dans un puits formé au centre d'un disque de matrice. L'étude a été réalisée sur 24 heures, en triplicat. Les résultats obtenus pour un réplicat représentatif sont présentés (**Figure 43**).

Des résultats similaires à ceux obtenus pour la biopsie de peau en flottaison sont observables : un front de diffusion est visible et s'étend progressivement du puits vers le bord de la boîte de Pétri au cours du temps (**Figure 43.A**).

Afin d'extraire un coefficient de diffusion, la même méthode que pour la biopsie de peau a été utilisée (**Figure 43.B et 43.C**). Dans ce cas, le flux de matière n'a lieu que par les bords, la surface inférieure de la matrice étant collée hermétiquement sur une boîte de Pétri, et la matrice étant transparente, le profil d'intensité observé à la surface est représentatif de la distribution des molécules dans l'échantillon, distribution qui suit une symétrie radiale. De plus, la matrice est un matériau isotrope.

Pour chaque réplicat, le coefficient de diffusion obtenu est présenté (**Figure 43.D**).

Le coefficient de diffusion moyen du colorant dans la matrice est de $1,4 \cdot 10^{-5} \pm 5,7 \cdot 10^{-7}$ cm²/s (mesure réalisée en triplicat). La matrice étant un hydrogel, il semble cohérent d'obtenir un coefficient de diffusion du colorant plus élevé dans la matrice que dans la peau.

1.3 Diffusion du colorant dans le modèle NativeSkin®

Dans le modèle NativeSkin®, les nutriments essentiels à la survie de la peau sont apportés via le milieu de culture. Comme décrit précédemment, ce milieu est déposé dans le puits de la plaque de culture, et diffuse passivement à travers la membrane poreuse de l'insert, d'abord dans la matrice, puis dans la biopsie de peau. Les modèles développés par la société Genoskin sont destinés à être commercialisés, et sont donc envoyés depuis Toulouse partout dans le monde. Les plaques de culture sont expédiées sans le milieu, c'est pourquoi la matrice maintenant les biopsies contient elle aussi du milieu de culture, afin d'approvisionner la peau en nutriments le temps du transport. La matrice est cependant moins concentrée, et ne contient que 40% de milieu de culture.

Afin de caractériser les échanges qui ont lieu à la fois entre le milieu de culture et la biopsie, et entre la matrice et la biopsie, et d'évaluer la contribution de chaque compartiment à l'approvisionnement en nutriments de la peau, deux types d'expériences ont été réalisées.

Tout d'abord, du colorant à 0,5 % (poids/volume) dans du PBS a été placé dans le puits de la plaque multipuits contenant le modèle NativeSkin®, à la place du milieu de culture (**Figure 44.A**). Dans un second temps, du colorant à 0,5 % poids/volume dans du PBS a été dilué dans la matrice du modèle NativeSkin®, à la place du milieu de culture utilisé habituellement (**Figure 44.B**). Les modèles ont été cultivés pendant 24 heures. L'étude a été réalisée en duplicat, sur trois donneurs indépendants. Les résultats obtenus pour un réplicat représentatif de l'ensemble des donneurs sont présentés (**Figure 44**).

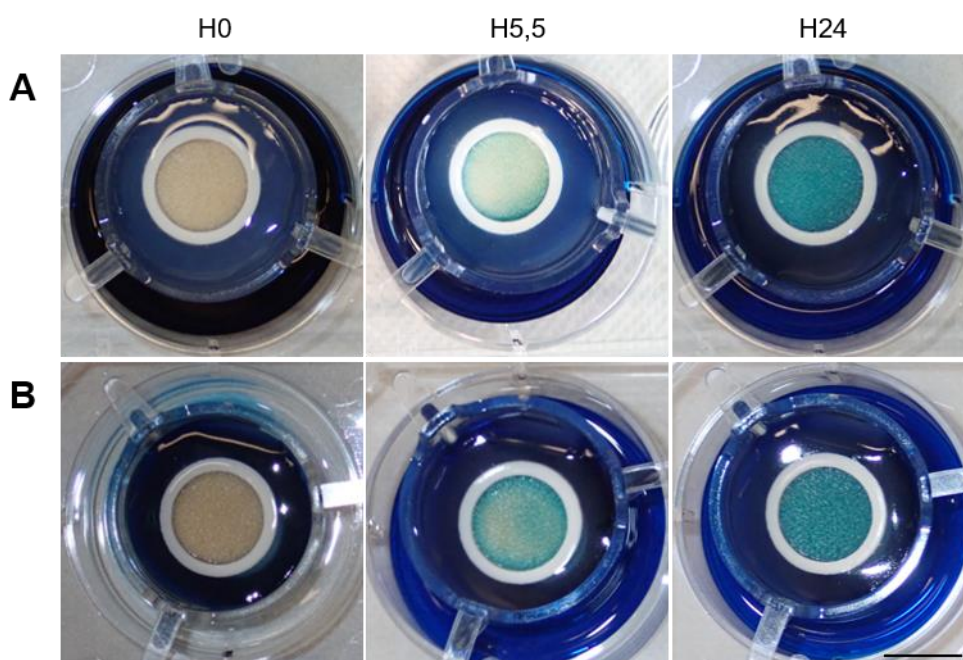


Figure 44. Caractérisation des échanges entre le milieu et la biopsie et entre la matrice et la biopsie dans le modèle NativeSkin®. L'étude a été réalisée sur 24 heures, en duplicat sur trois donneurs indépendants. Pour chaque condition, un réplikat représentatif de l'ensemble des donneurs est présenté. Barre d'échelle : 1 cm. **(A)** Du colorant alimentaire bleu à 0,5 % (poids/volume) dans du PBS a été déposé dans le puits de la plaque multipuits, à la place du milieu de culture. **(B)** Du colorant alimentaire bleu à 0,5 % (poids/volume) dans du PBS a été dilué dans la matrice du modèle NativeSkin®, à la place du milieu de culture utilisé habituellement.

Dans le cas où le colorant est présent dans le milieu de culture (**Figure 44.A**), une coloration de la matrice est observée en premier lieu, suivie d'une coloration de la surface de la peau, visible à la périphérie de l'œillet après 5 heures 30 de culture. Cette coloration devient plus intense et plus homogène après 24 heures. Une diminution de l'intensité de coloration du milieu est également observée, démontrant un effet de déplétion des espèces lié au flux de colorant vers la biopsie.

Dans le cas où le colorant est présent dans la matrice (**Figure 44.B**), une coloration du milieu de culture est très rapidement observée, démontrant la déplétion des espèces liée au flux de colorant vers le milieu de culture. Un gradient de concentration est clairement visible à la surface de la biopsie après 5 heures 30 de culture. La diffusion du colorant se poursuit au cours de la culture pour atteindre une situation qui semble proche de celle observée pour la première condition après 24 heures, avec des intensités de coloration qui s'homogénéisent dans les trois compartiments, montrant bien l'évolution du système vers un équilibre des concentrations.

Comme attendu, la diffusion est plus rapide depuis la matrice vers la biopsie que depuis le milieu de culture vers la biopsie.

L'intérêt de cette méthode d'analyse est double. Elle permet d'une part d'obtenir les temps caractéristiques et les coefficients de diffusion d'un composé dans différents milieux, qui nous seront par la suite utiles pour mettre en place un modèle numérique de la diffusion dans les modèles de peau. D'autre part, elle permet de visualiser macroscopiquement et qualitativement la diffusion d'un composé administré par différentes voies, et à différentes concentrations. La perfusion du colorant via le dispositif microporeux peut permettre de visualiser l'effet de différents paramètres de perfusion tels que le débit ou la pression, et ainsi d'effectuer une première sélection des paramètres qui semblent les plus appropriés avant de réaliser de nouvelles analyses plus quantitatives.

2. Evaluation de la diffusion en temps réel par radiographie à rayons X

Comme énoncée dans le paragraphe précédent, une des limites de l'utilisation d'un colorant pour analyser la diffusion dans un explant de peau est qu'elle permet de visualiser seulement la diffusion à la surface de la biopsie, et n'est donc pas représentative des différentes couches.

La radiographie à rayons X permet de pallier cette limite, tout en conservant la possibilité d'une analyse en temps réel. En effet, cette technique d'analyse permet d'obtenir une projection en 2D de toute l'épaisseur du tissu. Dans le cas de l'analyse de diffusion, cette technique nécessite l'utilisation d'un agent de contraste, tel que l'iode de potassium (KI), qui absorbe fortement les rayons X. Il est possible de suivre de façon dynamique la diffusion du KI au sein de l'échantillon en analysant l'évolution de la distribution spatiale des niveaux d'absorption de l'échantillon au cours du temps. A forte concentration (0,5 g/mL), l'agent de contraste apparaît en noir sur les radiographies obtenues, contrairement à la peau qui absorbe peu les rayons X et apparaît donc très claire.

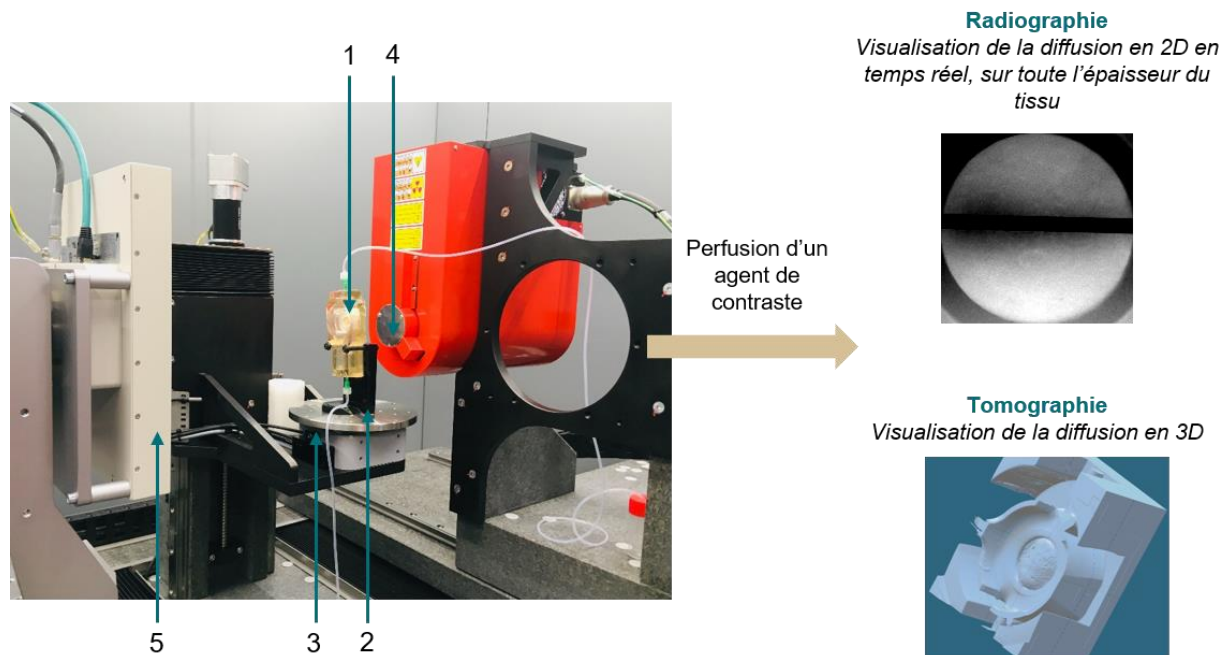


Figure 45. Présentation du système d'acquisition en radiographie et tomographie à rayons X (IMFT, Toulouse). L'échantillon de peau (1) est placé sur un socle (2), le tout sur une platine rotative (3). La source (4) envoie des rayons X à travers l'échantillon. Les rayons sont récupérés au niveau du détecteur (5). La perfusion d'un agent de contraste rend possible la visualisation de la diffusion dans deux modes d'acquisitions différents : la radiographie ou la tomographie.

L'iodure de potassium a un faible poids moléculaire, de l'ordre de 166 g/mol, et peut donc être assimilé aux composants majoritaires du milieu de culture utilisé pour la maintenance des modèles de peau.

Afin de pouvoir imager les explants de peau sur toute leur profondeur, les rayons X doivent traverser les biopsies, puis être récupérés au niveau d'un détecteur. Pour ce faire, le modèle de peau est placé verticalement sur un socle spécialement développé, de sorte à ce que l'épiderme soit face à la source, et le bas de l'insert face au détecteur (**Figure 45**). Des acquisitions sont réalisées à des intervalles de temps définis.

En revanche, cette méthode d'analyse ne peut pas être appliquée à une biopsie en flottaison ou au modèle NativeSkin®, et de façon plus générale à l'étude de la diffusion passive de l'agent de contraste dans la peau. En effet, la disposition du modèle de peau dans l'appareil nécessite qu'il soit à la verticale, aucun liquide ne peut donc être disposé dans le puits de la plaque de culture. De plus, nous avons observé une resolubilisation de la matrice au contact de l'agent de contraste probablement due au changement de force ionique induit par la diffusion de l'iodure de potassium, endommageant fortement le modèle (données non présentées).

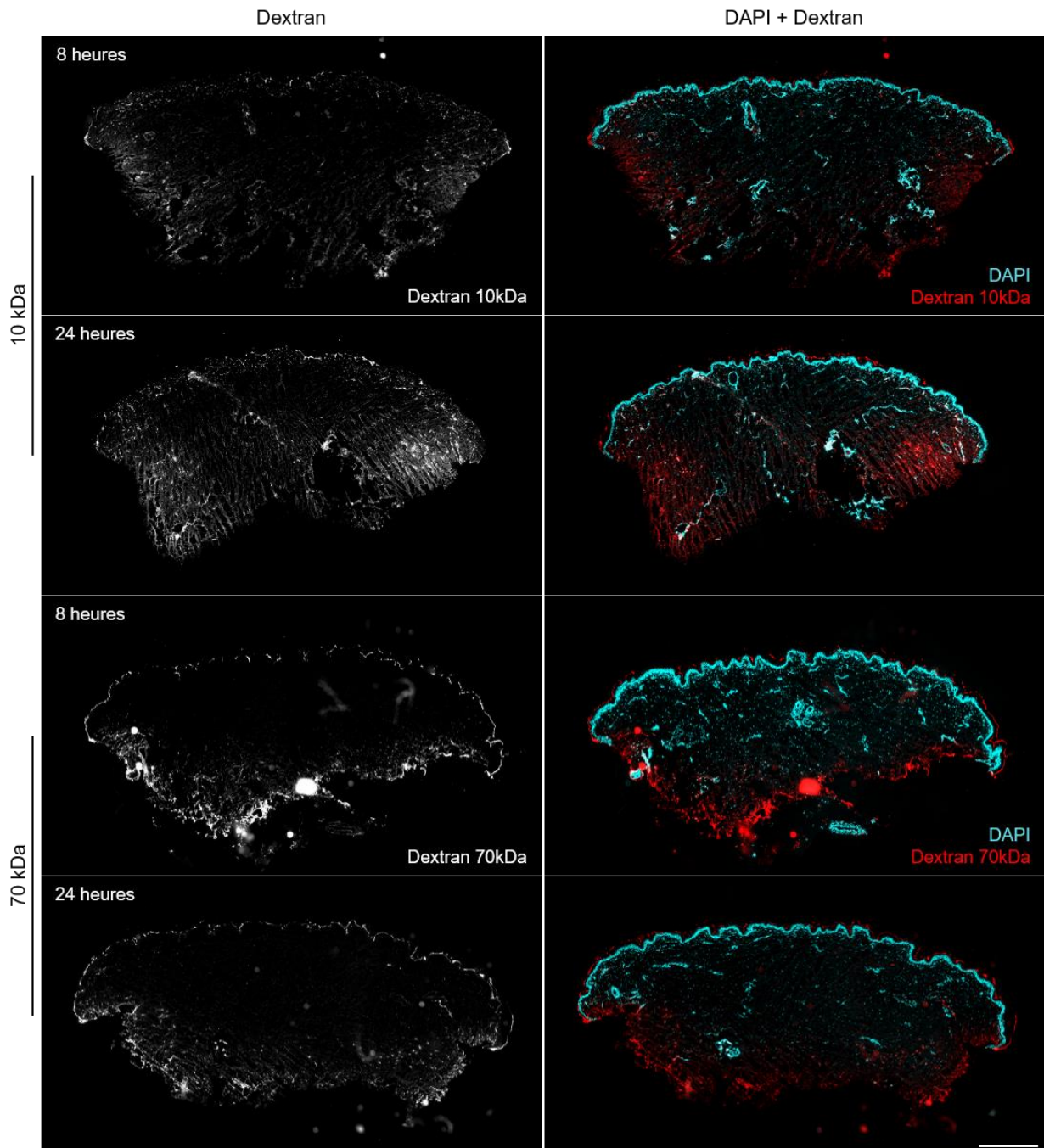
La diffusion d'un agent de contraste de poids moléculaire semblable à celui des composants majoritaires du milieu de culture des modèles de peau, perfusé via le système FlowSkin, peut être analysée par radiographie à rayons X. Cette méthode d'analyse permet d'étudier la diffusion du composé en temps réel, et sur toute la profondeur du tissu.

3. Evaluation de la diffusion en 3 dimensions par tomographie à rayons X

Le système utilisé dans ces expériences permet de réaliser des radiographies mais également des acquisitions en mode tomographie. Pour cela, l'échantillon est placé sur une platine rotative (**Figure 45**). Des radiographies sont réalisées à différents angles, sur 360° pour ensuite reconstruire une distribution des niveaux d'absorption dans l'ensemble de l'échantillon. Cette méthode nécessite de réaliser un grand nombre d'images (> 1000) qui sont ensuite traitées grâce à un logiciel de reconstruction 3D.

Tout comme la radiographie à rayons X, la tomographie à rayons X ne peut pas être utilisée sur le modèle NativeSkin® ou sur une biopsie en flottaison.

La tomographie à rayons X permet de visualiser la diffusion d'un agent de contraste de poids moléculaire semblable à celui des composants majoritaires du milieu de culture des modèles de peau, perfusé via le système FlowSkin, en trois dimensions.



4. Evaluation de la diffusion de dextrans fluorescents de différents poids moléculaires

Un des objectifs du système FlowSkin est la perfusion de composés au sein d'un modèle de peau *ex vivo*. Ces composés peuvent être de différentes natures et de différents poids moléculaires, tels que par exemple :

Du milieu de culture dont les composants majoritaires ont un poids moléculaire de l'ordre de 100 à 200 Da, afin d'améliorer l'approvisionnement en nutriments au cœur du tissu,
Des cytokines pro-inflammatoires dans le but d'induire une inflammation dans le modèle de peau *ex vivo* (6 à 60 kDa),

Des médicaments, par exemple des anticorps thérapeutiques (150 kDa), dans le but d'étudier leur efficacité ou leur innocuité sur la peau,

Des transporteurs d'oxygène telles que les hémoglobines issues de vers marins commercialisées par la société Hemarina (4000 kDa).

Il est donc nécessaire d'évaluer l'efficacité du dispositif d'injection et d'étudier la diffusion pour des composés de différents poids moléculaires dans la peau.

Pour cela, des dextrans couplés à des fluorophores ont été utilisés. Les dextrans sont des polysaccharides disponibles dans une large gamme de poids moléculaires, avec une bonne solubilité en solution aqueuse et une faible cytotoxicité. Dans un premier temps, deux types de dextrans ont été utilisés :

- Un dextran de 10 kDa couplé à de l'Alexa Fluor 647,
- Un dextran de 70 kDa couplé à du Texas Red.

Contrairement aux trois méthodes d'analyse décrites précédemment, celle-ci ne peut pas être réalisée en dynamique. En effet, elle nécessite la fixation ou la congélation des échantillons, afin de réaliser des coupes histologiques.

La méthode d'analyse en question a d'abord été développée sur deux modèles simples : des biopsies en flottaison et le modèle NativeSkin®. Elle a ensuite été transposée au modèle FlowSkin afin de caractériser la diffusion de composés perfusés dans le tissu via le dispositif microporeux.

4.1 Diffusion des dextrans dans une biopsie en flottaison

La diffusion des dextrans a tout d'abord été évaluée dans des biopsies de peau, placées en flottaison sur une solution de dextran à 0,08 mg/mL dans du PBS, pendant 8 ou 24 heures (**Figure 46**). L'expérience a été réalisée en duplicats pour chaque condition, sur un même donneur. Les résultats obtenus pour une biopsie représentative sont présentés pour chaque condition et pour chaque temps de cinétique.

Les résultats obtenus montrent un gradient d'intensité depuis les côtés des biopsies de peau vers le centre, mais aussi de la surface inférieure du derme vers la couche cornée de l'épiderme, assimilable à un gradient de concentration (**Figure 46**).

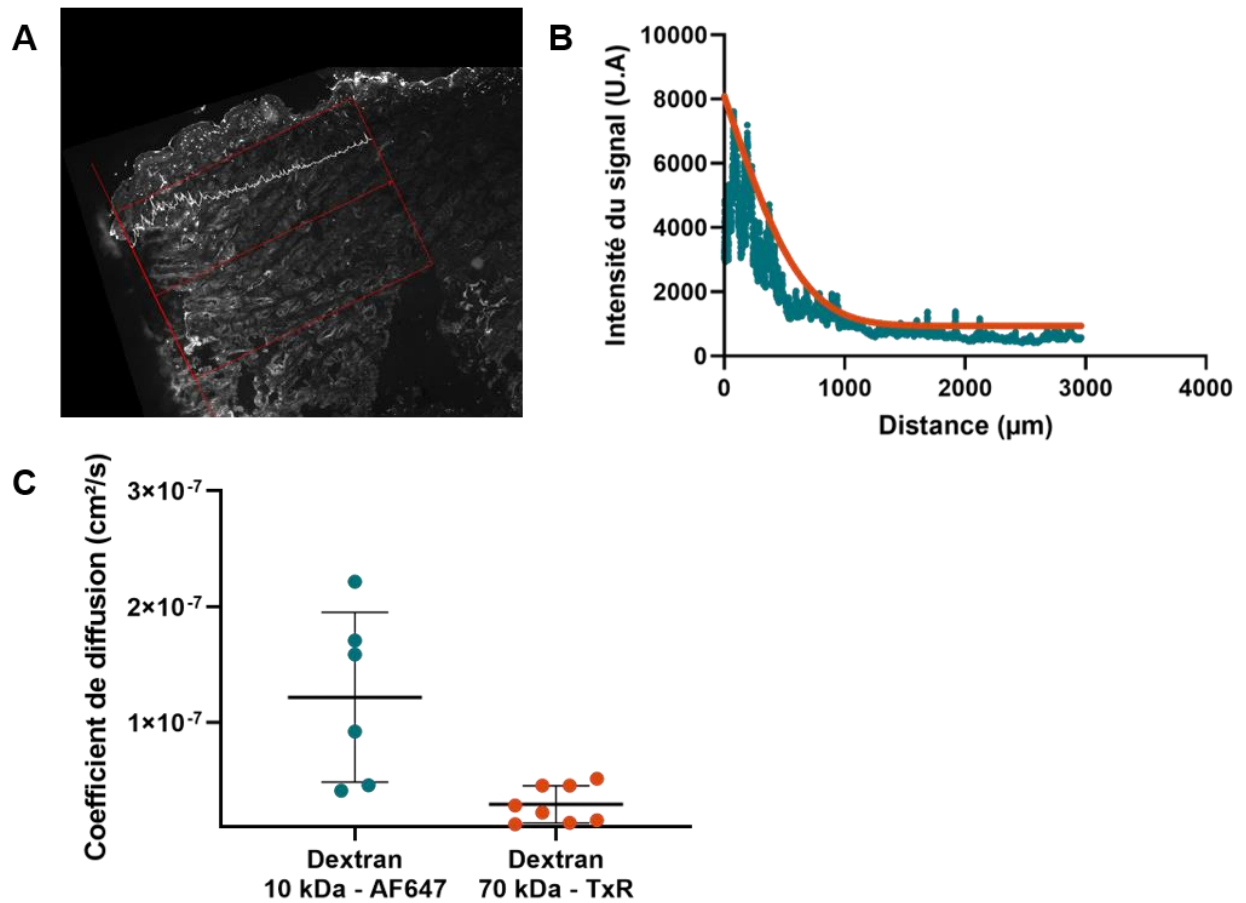


Figure 47. Détermination du coefficient de diffusion des dextrans dans la peau. (A) A partir des images obtenues en fluorescence, l'intensité du signal de chaque dextran a été mesurée depuis le bord de la biopsie. Pour cela, un rectangle (en rouge) a été défini perpendiculairement au côté de la biopsie. La moyenne des niveaux de gris de chaque pixel a été calculée sur toute l'épaisseur du rectangle, en allant du bord vers le centre de la biopsie. **(B)** Le graphe présente les valeurs obtenues expérimentalement (en bleu), et la courbe de tendance obtenue grâce à la fonction d'erreur (en orange). $R^2=0,94969$. **(C)** Les mesures ont été réalisées sur 6 coupes pour chaque dextran. Le graphe présente les valeurs des coefficients de diffusion obtenus, ainsi que la moyenne et l'écart-type pour chaque condition.

En ce qui concerne les biopsies en flottaison sur une solution de dextran de 10 kDa, un front de diffusion est déjà bien visible dès 8 heures de culture, notamment sur les côtés de la biopsie. Après 24 heures de culture, ce front de diffusion semble avoir progressé vers le centre de la biopsie, et l'intensité semble être plus élevée.

Pour les biopsies en flottaison sur une solution de dextran de 70 kDa, le front de diffusion est également bien visible dès 8 heures de culture. En revanche, en comparaison avec le dextran de 10 kDa, la progression du front de diffusion à 8 heures et celui à 24 heures de culture est plus difficile à évaluer : le dextran de 10 kDa semble diffuser moins rapidement dans la peau que celui de 70 kDa. Il est cependant difficile de conclure quant à la réelle différence de vitesse de diffusion entre les deux dextrans, à cause de la différence de morphologie observée entre les différents échantillons due à la déformation de ces derniers lors des processus de congélation et de coupe.

Afin de vérifier cette hypothèse et d'extraire des données quantitatives de cette expérience, des coefficients de diffusion des dextrans dans la peau ont été calculés. Pour ce faire, l'intensité de fluorescence est assimilée à la concentration en dextran dans la peau. Comme pour les données extraites des expériences réalisées avec le colorant alimentaire bleu, le terme « coefficient de diffusion » employé doit être nuancé. En effet, le flux de matière ne se fait pas seulement par les côtés de la biopsie, mais également par la surface inférieure du derme. Afin de pouvoir négliger ce phénomène, l'intensité de fluorescence a été mesurée depuis le bord de la biopsie vers le centre de la biopsie, sur une hauteur d'environ 2 mm, afin de ne pas prendre en compte la surface inférieure de la biopsie au niveau de laquelle le flux de dextran a potentiellement une incidence sur l'intensité du signal (**Figure 47.A**). La méthode utilisée pour calculer ce coefficient est décrite dans la partie Matériel & Méthodes (**Paragraphe 4.3.3**).

Les mesures ont été réalisées sur six coupes par dextran. Pour chaque condition, les valeurs des coefficients de diffusion obtenues ainsi que la moyenne et l'écart-type sont présentés (**Figure 47.C**).

Le coefficient de diffusion moyen du dextran de 10 kDa dans la peau est de $1,22 \cdot 10^{-7} \pm 7,33 \cdot 10^{-8}$ cm²/s. Le coefficient de diffusion moyen du dextran de 70kDa dans la peau est de $2,98 \cdot 10^{-8} \pm 1,61 \cdot 10^{-8}$ cm²/s. Ces résultats sont donc cohérents avec l'hypothèse émise précédemment : le dextran de 10 kDa diffuse plus rapidement dans la peau que le dextran de 70kDa.

4.2 Diffusion des dextrans dans le modèle NativeSkin®

La diffusion des dextrans de 10 et 70 kDa a ensuite été caractérisée dans le modèle NativeSkin®. Pour cela, une solution de dextran de 10 ou 70 kDa a été placée dans le puits de la plaque multipuits, à la place du milieu de culture. Les modèles ont été cultivés pendant 8 ou 24 heures. L'expérience a été réalisée sur deux donneurs indépendants. Une photo représentative de l'ensemble des donneurs est présentée, pour chaque condition et pour chaque temps de cinétique (**Figure 48**).

Un signal ponctiforme est visible à la périphérie des biopsies de peau dès 8 heures de culture, dans le cas des modèles cultivés en présence du dextran de 10 kDa. Ce dernier a donc diffusé dans la matrice jusqu'à la biopsie dans ce laps de temps. Cet aspect ponctiforme du signal pourrait être dû à l'internalisation de ce dernier par les cellules. Après 24 heures de culture, un signal est observé dans l'ensemble de la biopsie, et particulièrement intense en périphérie, démontrant que le dextran a diffusé dans toute la biopsie en 24 heures (**Figure 48**). Un signal plus intense en périphérie pourrait être dû à des artéfacts provoqués par la coupe de tissu.

Après 8 heures de culture, aucun signal n'est visible dans les modèles cultivés en présence du dextran de 70 kDa. Un léger signal ponctiforme est visible en périphérie des modèles, après 24 heures de culture seulement. Le dextran de 70 kDa diffuse donc beaucoup moins rapidement dans la matrice que le dextran de 10kDa (**Figure 48**).

Ces résultats mettent en évidence l'intérêt potentiel d'une perfusion intra tissulaire pour favoriser le transport de molécules de haut poids moléculaire au sein de la biopsie, pour lesquelles la diffusion passive semble limitée.

La méthode d'analyse développée, basée sur l'utilisation de dextrans fluorescents, permet d'observer et de quantifier la diffusion de composés de différents poids moléculaires. Appliquée au système FlowSkin, cette méthode d'analyse peut permettre d'étudier le comportement de ces différents composés, à travers les pores du cathéter implanté. En revanche, contrairement aux techniques décrites précédemment, cette méthode ne permet pas une étude dynamique de la diffusion.

5. Simulation numérique de la diffusion d'un composé dans un modèle de peau humaine ex vivo

Toutes les méthodes d'analyse de la diffusion décrites dans ce chapitre vont permettre, dans le cadre du modèle FlowSkin, d'étudier les échanges entre la peau et la solution infusée à travers les pores du cathéter, en fonction des différents paramètres de perfusion appliqués. Ainsi, les paramètres les plus adéquats pour l'application souhaitée pourront être déterminés.

Cependant, ces méthodes d'analyse sont consommatrices de temps, de consommables, de produits et d'échantillons biologiques. Il serait donc intéressant de pouvoir prédire le comportement d'un fluide perfusé dans le modèle FlowSkin, sans avoir à passer systématiquement et directement par l'expérience.

Pour ce faire, nous avons tenté de développer un modèle numérique permettant de simuler la diffusion d'un composé dans les explants de peau, grâce au logiciel COMSOL. La géométrie du modèle a été reproduite sur le logiciel, puis les coefficients de diffusion mesurés expérimentalement ont été intégrés. La loi de Fick a ensuite été appliquée pour simuler la diffusion des espèces dans la peau. Un système simple a tout d'abord été modélisé : une biopsie en flottaison. La modélisation a ensuite été complexifiée avec le modèle NativeSkin®, puis avec le modèle FlowSkin. Toutes les simulations présentées dans ce chapitre ont été obtenues à partir des coefficients de diffusion du colorant alimentaire dans les différents milieux.

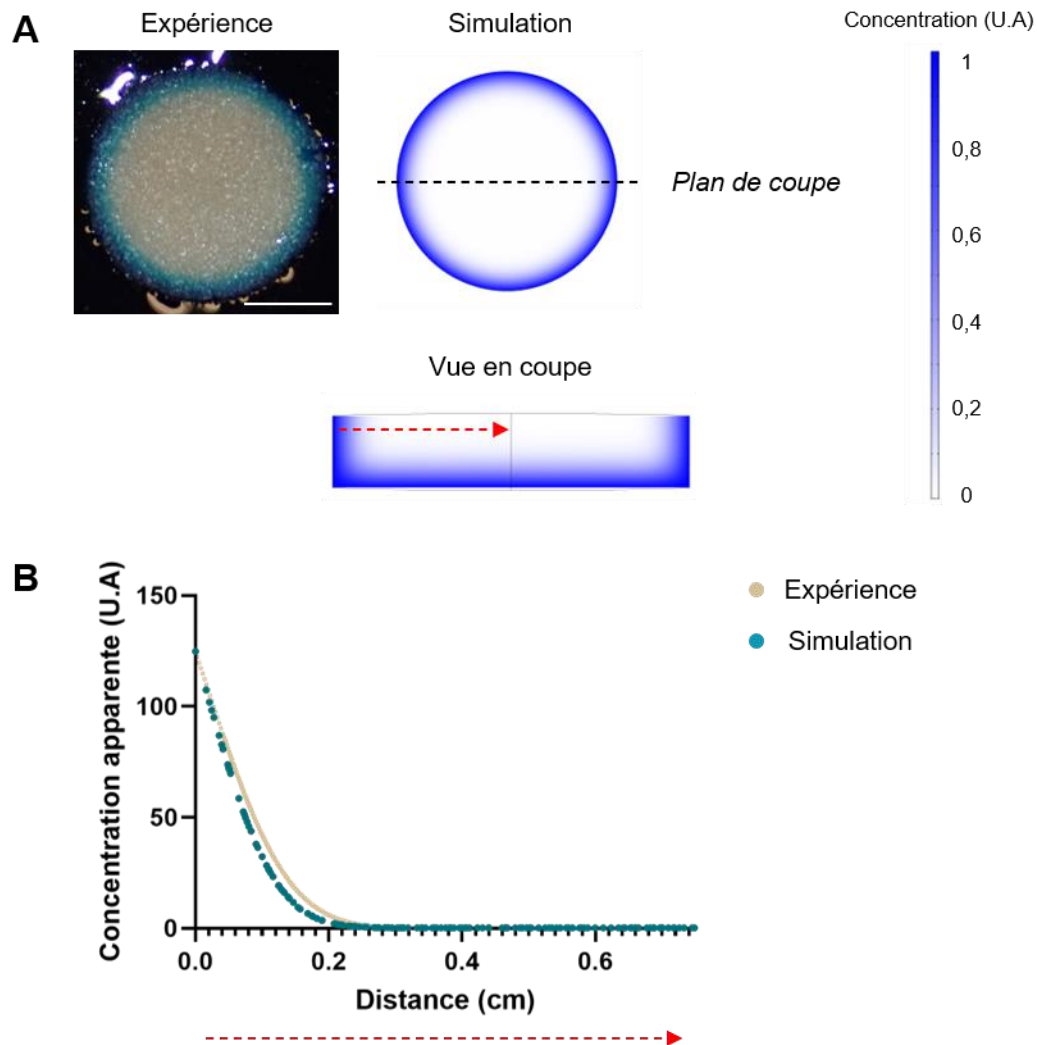


Figure 49. Simulation de la diffusion d'un colorant dans une biopsie en flottaison. La diffusion d'un colorant dans une biopsie en flottaison a été simulée à l'aide du logiciel COMSOL. Le coefficient de diffusion du composé dans la peau utilisé pour la simulation est de $9,3 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$. **(A)** Analyse macroscopique de la diffusion du colorant à la surface de la peau après 1 heure de culture et comparaison entre l'expérience (gauche) et la simulation (droite). Barre d'échelle : 5 mm. Une vue en coupe de la simulation de la diffusion du colorant dans l'épaisseur de la biopsie est également présentée. Le plan de coupe est défini par les pointillés noirs. **(B)** La concentration en colorant a été calculée à la surface de la biopsie, depuis le bord de la biopsie jusqu'au centre (flèche en pointillés rouges). Les valeurs obtenues sont comparées avec les valeurs déterminées expérimentalement.

L'objectif de ce modèle numérique est double : d'une part de démontrer que la diffusion est le mécanisme prépondérant qui régit le transport moléculaire au sein de la biopsie, et d'autre part de mettre en place un modèle prédictif permettant d'anticiper la distribution spatiale et temporelle des espèces moléculaires au sein de la biopsie.

5.1 Simulation de la diffusion d'un composé dans une biopsie en flottaison

Dans un premier temps, la diffusion d'un composé dans une biopsie de peau en flottaison a été modélisée. Les résultats obtenus par la simulation sont comparés aux résultats expérimentaux, afin de valider la méthode utilisée (**Figure 49**). La simulation permet également de valider certaines hypothèses posées lors de la détermination du coefficient de diffusion du colorant alimentaire dans la peau (**Figure 50**).

5.1.1. Comparaison entre la simulation et l'expérience

Visuellement, les cinétiques de diffusion obtenues expérimentalement et celle de la simulation semblent comparables (**Figure 49.A**). Afin de vérifier cela quantitativement, la courbe de la concentration en fonction de la distance du bord au centre de la biopsie a été tracée à partir des valeurs obtenues avec la simulation, et comparée avec celle obtenue expérimentalement (**Figure 49.B**). Les profils de diffusion obtenus sont très similaires. La loi de Fick semble donc applicable à la diffusion radiale d'un colorant dans une biopsie de peau dans les conditions expérimentales choisies.

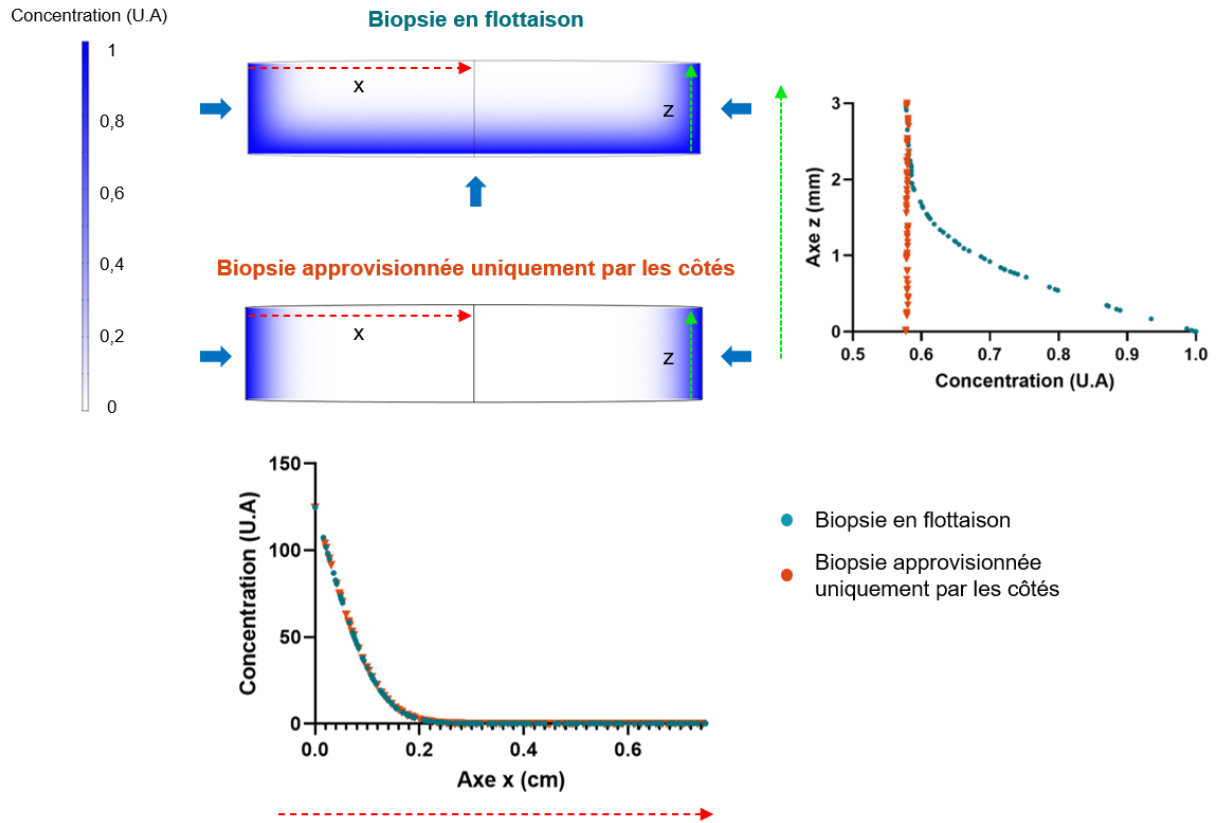


Figure 50. Simulation de la diffusion dans une biopsie en flottaison sur du colorant vs dans une biopsie approvisionnée en colorant uniquement par les côtés. La diffusion d'un colorant dans une biopsie a été simulée sur COMSOL pour deux conditions : une biopsie en flottaison, qui est donc approvisionnée en colorant par les côtés et par le dessous, et une biopsie approvisionnée uniquement par les côtés. Le coefficient de diffusion du composé dans la peau utilisé pour la simulation est de $9,3 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$. Pour chacune de ces deux conditions, la concentration en colorant a été calculée suivant un axe en x (flèche en pointillés rouge), ou bien suivant un axe en z en périphérie de la biopsie (flèche en pointillés verts). Les résultats obtenus pour la biopsie en flottaison sont présentés en bleu. Les résultats obtenus pour la biopsie approvisionnée uniquement par le dessous sont présentés en orange.

5.1.2. Validation des hypothèses posées

Afin de déterminer une estimation moyenne du coefficient de diffusion du colorant dans la peau, certaines hypothèses ont dû être posées (**Paragraphe 1.1**). L'une d'entre elles est que, à des courts temps de culture (1 heure), la diffusion du colorant depuis la surface inférieure du derme n'a pas d'impact sur la concentration à la surface de la peau. Afin de vérifier cette hypothèse, deux cas de figure ont été modélisés :

- La diffusion du colorant dans une biopsie en flottaison, c'est-à-dire pour laquelle un flux de matière a lieu depuis les côtés et depuis la surface inférieure,
- La diffusion d'un colorant dans une biopsie pour laquelle un flux de matière a lieu uniquement par les côtés.

Les résultats obtenus pour ces deux conditions ont été comparés (**Figure 50**).

La concentration en colorant à la surface de la peau semble la même après 1 heure de culture, que le flux de matière ait lieu par le dessous ou non.

Dans le cas d'une biopsie approvisionnée uniquement par les côtés, la concentration à la périphérie de la biopsie est la même sur toute son épaisseur, et égale à environ 0,58 U.A. Dans le cas d'une biopsie en flottaison, la concentration est élevée dans le bas du derme, puis diminue progressivement jusqu'à l'épiderme. Environ 1 mm sous la surface de la biopsie, la concentration en colorant atteint les 0,6 U.A, et est constante jusqu'à la surface. Ces résultats démontrent le fait que le flux de colorant par la surface inférieure de la biopsie n'a pas d'incidence significative sur la concentration en colorant à la surface après 1 heure culture. Cela permet de valider l'hypothèse posée pour la détermination du coefficient de diffusion du colorant dans la peau.

5.2 Simulation de la diffusion d'un composé dans le modèle NativeSkin®

Une fois validée sur une biopsie en flottaison, la modélisation COMSOL a ensuite été complexifiée afin de simuler la diffusion dans le modèle NativeSkin®. Cette modélisation permet, en affectant des concentrations initiales aux différents compartiments du modèle, de simuler la diffusion d'un composé administré par différentes voies. Dans le modèle NativeSkin®, un composé peut être administré :

- Via la matrice du modèle de peau,
- Via le milieu de culture du modèle de peau,
- A la fois via la matrice et via le milieu de culture du modèle de peau.

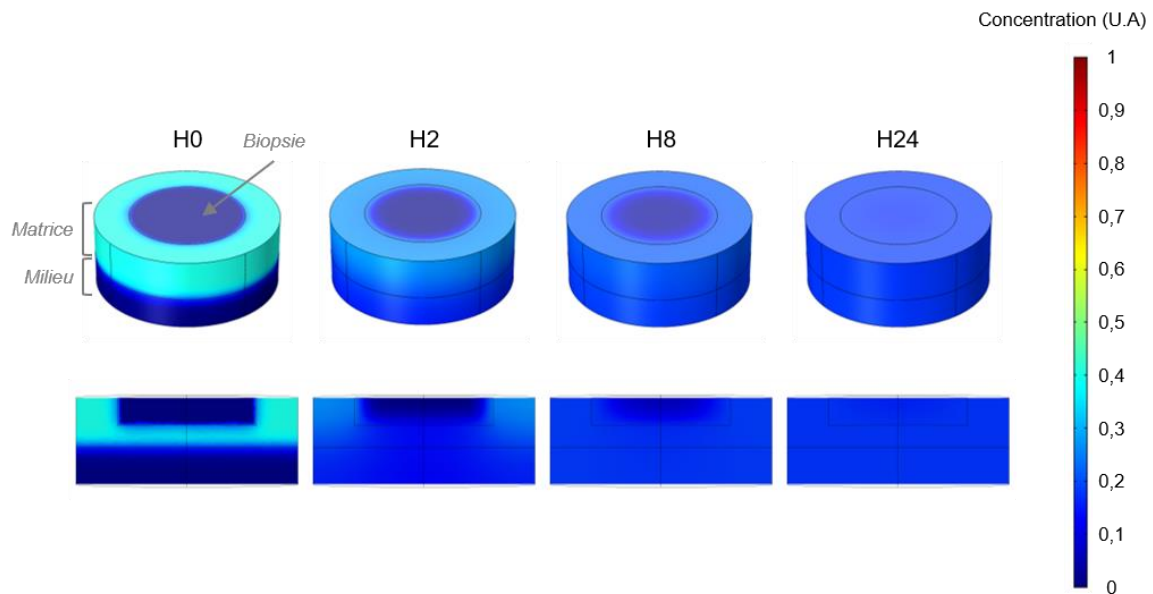


Figure 51. Simulation de la diffusion d'un composé présent dans la matrice du modèle NativeSkin®. La diffusion d'un composé d'environ 1 kDa dans le modèle NativeSkin® a été simulée à l'aide du logiciel COMSOL. A l'état initial, ce composé est présent uniquement dans la matrice, à une concentration arbitraire égale à 0,4 U.A (cyan). La concentration en composé dans le milieu de culture et dans la biopsie est égale à 0 U.A (bleu foncé). Les coefficients de diffusion utilisés pour la simulation sont les suivants : $9,3 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$ pour le coefficient de diffusion du composé dans la peau, $1,4 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$ pour le coefficient de diffusion du composé dans la matrice et $2 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$ pour le coefficient de diffusion du composé dans le milieu de culture. Une vue d'ensemble et une vue en coupe selon un axe perpendiculaire à la surface de la biopsie sont présentées, à différents temps de cinétique.

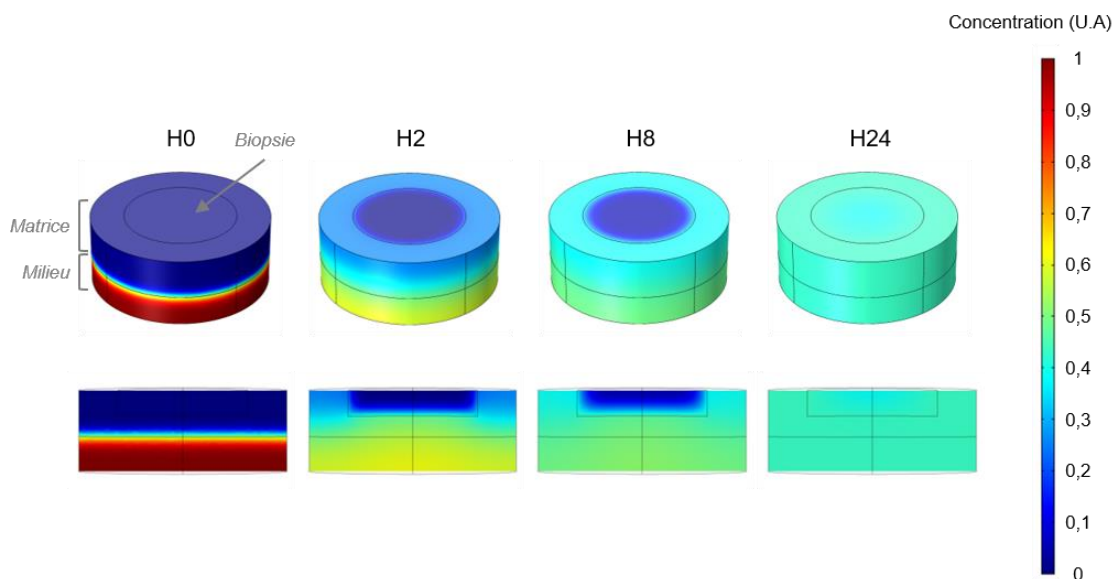


Figure 52. Simulation de la diffusion d'un composé présent dans le milieu de culture du modèle NativeSkin®. La diffusion d'un composé d'environ 1 kDa dans le modèle NativeSkin® a été simulée à l'aide du logiciel COMSOL. A l'état initial, ce composé est présent uniquement dans le milieu de culture, à une concentration arbitraire égale à 1 U.A (rouge foncé). La concentration en composé dans la matrice et dans la biopsie est égale à 0 U.A (bleu foncé). Les coefficients de diffusion utilisés pour la simulation sont les suivants : $9,3 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$ pour le coefficient de diffusion du composé dans la peau, $1,4 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$ pour le coefficient de diffusion du composé dans la matrice et $2 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$ pour le coefficient de diffusion du composé dans le milieu de culture. Une vue d'ensemble et une vue en coupe selon un axe perpendiculaire à la surface de la biopsie sont présentées, à différents temps de cinétique.

5.2.1. Diffusion d'un composé présent uniquement dans la matrice

La diffusion d'un composé présent dans la matrice à une concentration initiale arbitraire égale à 0,4 U.A est présentée pour différents temps de cinétique (**Figure 51**). Cette concentration a été choisie car elle correspond au ratio de milieu de culture présent dans la matrice du modèle NativeSkin® pour une concentration arbitraire du milieu de culture égale à 1 U.A.

Les résultats obtenus montrent une déplétion très rapide des espèces de la matrice vers le milieu de culture : après 2 heures de diffusion, la concentration en composé dans ces deux compartiments semble être la même. La diffusion des espèces dans la biopsie est plus lente : un front de diffusion très net est observable à la surface des modèles à 2 et 8 heures de culture. Après 24 heures de diffusion, le modèle semble avoir atteint un état d'équilibre et la concentration en composé converge vers une même valeur d'équilibre dans les trois compartiments, de l'ordre de 0,2 U.A.

5.2.2. Diffusion d'un composé présent uniquement dans le milieu de culture

La diffusion d'un composé présent dans le milieu de culture à une concentration initiale arbitraire égale à 1 est présentée pour différents temps de cinétique (**Figure 52**).

Les résultats obtenus montrent une déplétion des espèces très rapide du milieu de culture vers la matrice : après 2 heures de culture, la concentration en composé dans le milieu semble avoir diminué de moitié. La diffusion des espèces dans la biopsie est plus lente : la partie centrale de la biopsie ne semble pas avoir été approvisionnée après 8 heures de culture. Après 24 heures de culture, la concentration semble être homogène entre le milieu de culture et la matrice, de l'ordre de 0,45 U.A. En revanche, la concentration ne semble pas encore homogène dans la biopsie.

Si on se place dans le cas de l'approvisionnement en nutriments dans le modèle, ces résultats démontrent l'intérêt de diluer du milieu de culture dans la matrice, afin de permettre un approvisionnement plus rapide de la biopsie durant les premières heures de culture.

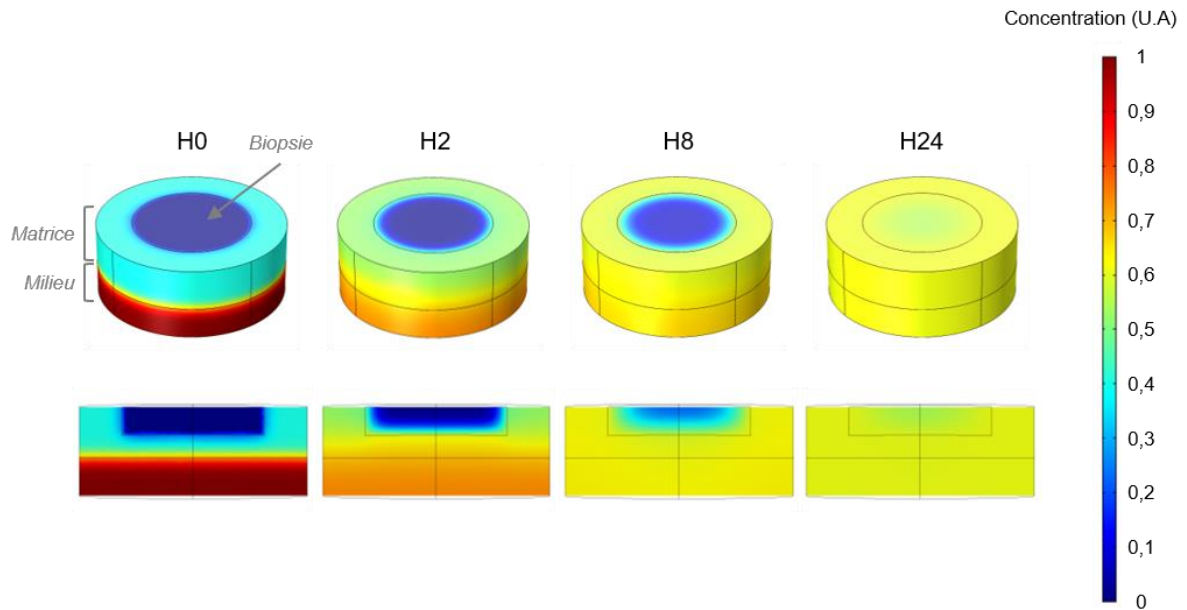


Figure 53. Simulation de la diffusion d'un composé présent dans le milieu de culture et dans la matrice du modèle NativeSkin®. La diffusion d'un composé d'environ 1 kDa dans le modèle NativeSkin® a été simulée à l'aide du logiciel COMSOL. A l'état initial, ce composé est présent à la fois dans le milieu de culture à une concentration arbitraire égale à 1 U.A (rouge foncé), et dans la matrice à une concentration égale à 0,4 U.A (cyan). Cette configuration est représentative de la diffusion du milieu de culture dans le modèle NativeSkin®, que l'on retrouve également dilué dans la matrice. Les coefficients de diffusion utilisés pour la simulation sont les suivants : $9,3 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$ pour le coefficient de diffusion du composé dans la peau, $1,4 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$ pour le coefficient de diffusion du composé dans la matrice et $2 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$ pour le coefficient de diffusion du composé dans le milieu de culture. Une vue d'ensemble et une vue en coupe selon un axe perpendiculaire à la surface de la biopsie sont présentées, à différents temps de cinétique.

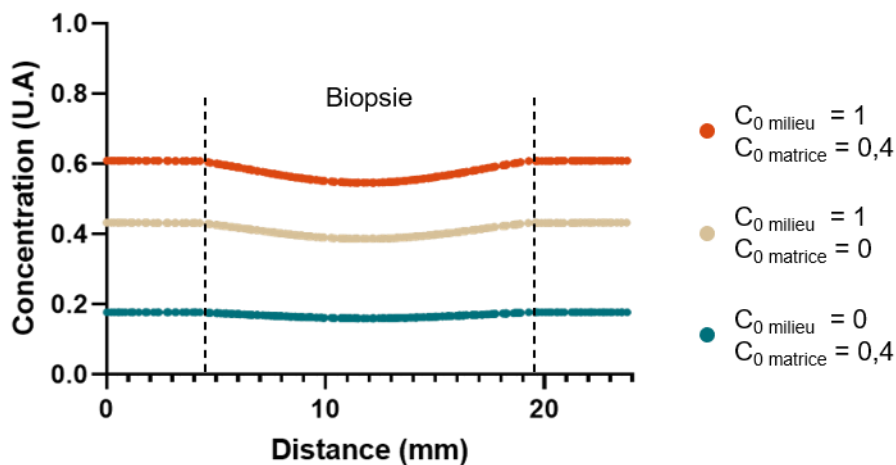


Figure 54. Comparaison de la diffusion d'un composé pour différentes voies d'administration après 24 heures de culture. Pour chacune des configurations présentées précédemment, la concentration en composé à la surface de la peau a été étudiée après 24 heures de culture. Orange : le composé est présent à la fois dans le milieu de culture et dans la matrice à l'état initial. Beige : le composé n'est présent que dans le milieu de culture à l'état initial. Bleu : le composé n'est présent que dans la matrice à l'état initial.

5.2.3. Diffusion d'un composé présent à la fois dans le milieu de culture et dans la matrice

La diffusion d'un composé présent à la fois dans le milieu de culture à une concentration initiale arbitraire égale à 1 et dans la matrice à une concentration initiale égale à 0,4 U.A est présentée pour différents temps de cinétique (**Figure 53**). Cette configuration est représentative de la diffusion des composants du milieu de culture dans la peau, qui sont également dilués dans la matrice.

Les résultats obtenus montrent une déplétion des espèces du milieu de culture vers la matrice, ce dernier étant plus concentré, mais cette déplétion est moins rapide que celle observée précédemment. Dans cette configuration, la concentration semble être homogène entre le milieu et la matrice dès 8 heures de culture, et de l'ordre de 0,6 U.A. La diffusion dans la biopsie est également plus rapide : la partie centrale de la biopsie semble approvisionnée dès 8 heures, avec une concentration de l'ordre de 0,2 U.A.

5.2.4. Comparaison des différentes voies d'administration

Afin de comparer ces différentes voies d'administration, la concentration en composé à la surface du modèle a été étudiée après 24 heures de culture (**Figure 54**).

Les résultats obtenus montrent que pour chacune des voies d'administration, le composé a diffusé dans l'ensemble de la biopsie, mais la concentration en composé n'est pas homogène à la surface des modèles de peau : celle au centre reste légèrement inférieure à celle en périphérie des modèles. Après 24 heures de diffusion, la concentration au centre de la biopsie est d'environ 0,54 U.A dans le cas où le composé est administré à la fois via le milieu de culture et via la matrice, contre environ 0,38 U.A dans le cas où le composé n'est présent que dans le milieu initialement, et 0,16 U.A lorsqu'il n'est présent que dans la matrice au début de la culture.

Grâce aux estimations moyennes des coefficients de diffusion obtenues expérimentalement, un modèle numérique de la diffusion de composés dans des explants de peau a pu être développé. Cette simulation a diverses applications : elle permet d'une part de valider les hypothèses posées précédemment lors de la détermination des coefficients de diffusion, mais également de prédire la diffusion de composés administrés selon différentes voies d'administration, sans avoir à passer systématiquement ou directement par l'expérience. Appliqué au modèle FlowSkin, ce modèle pourra également permettre de vérifier que les résultats observés expérimentalement sont conformes à ceux prédits par la simulation, et ainsi valider que la perfusion se déroule correctement.

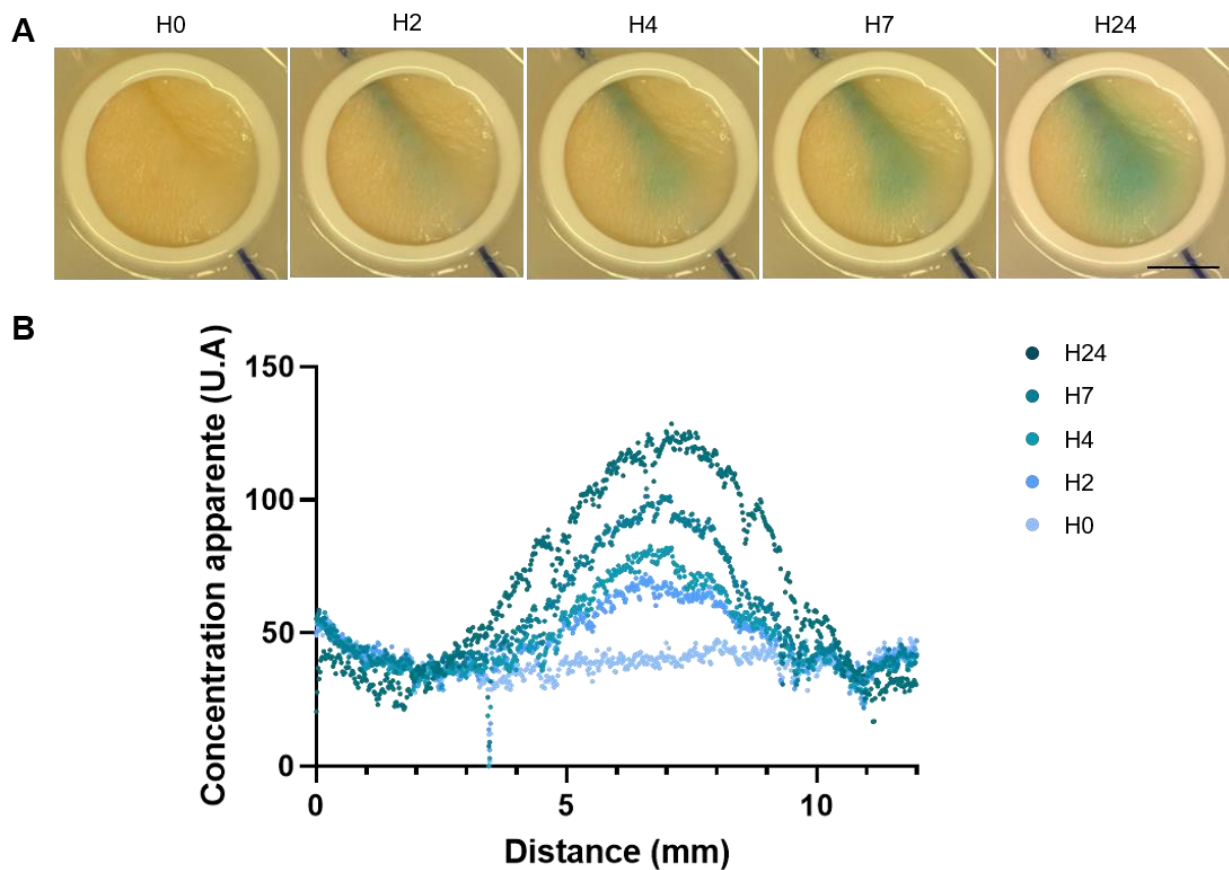


Figure 55. Evaluation macroscopique de la diffusion d'un colorant dans le modèle FlowSkin durant le premier jour de culture. Des modèles FlowSkin ont été perfusés pendant 24 heures avec un colorant alimentaire bleu à 0,5 % (poids/volume) dans du PBS, à un débit moyen de 2,5 $\mu\text{L}/\text{min}$ (5 $\mu\text{L}/\text{min}$ pendant 30 secondes puis arrêt de la perfusion pendant 30 secondes). **(A)** Des photos de la surface des modèles ont été prises à différents temps de cinétique. Barre d'échelle : 5 mm. **(B)** Le graphe présente la concentration apparente en colorant à la surface du modèle selon un axe centré sur la biopsie, perpendiculaire à l'axe d'implantation du cathéter, pour chaque temps de cinétique. Ce graphe a été obtenu grâce à la mesure des intensités de coloration à la surface de la peau, tel que décrit dans le paragraphe 4.1.2.b de la partie Matériel & Méthodes de ce manuscrit.

Partie 3. Evaluation des effets de la perfusion sur le modèle FlowSkin

Le troisième et dernier objectif de mes travaux a consisté à déterminer les paramètres de perfusion les plus adaptés, c'est-à-dire permettant une délivrance homogène et contrôlée des composés dans l'explant de peau, sans toutefois endommager le tissu. Pour cela, différents paramètres de perfusion ont été testés. La diffusion des composés dans le modèle perfusé a été étudiée, à l'aide des méthodes d'analyses développées et décrites dans la deuxième partie de ce manuscrit. La caractérisation du modèle perfusé a ensuite été réalisée au moyen de différentes techniques histologiques et biochimiques.

1. Paramètres de perfusion

Différents paramètres de perfusion peuvent être modulés au sein du dispositif microporeux tels que le débit de perfusion, la pression au sein du dispositif microporeux ou le cycle de perfusion appliqué.

Afin de sélectionner les paramètres de perfusion les plus adaptés, une évaluation macroscopique de la diffusion d'un colorant a tout d'abord été réalisée, pour différents paramètres (données non présentées).

A l'issue de ces premières mises au point, des paramètres ont été sélectionnés et utilisés afin d'évaluer l'impact de la perfusion sur le modèle FlowSkin :

- Un débit moyen de 2,5 $\mu\text{L}/\text{min}$, ce qui est cohérent avec les débits traditionnellement utilisés pour de la microdialyse par exemple, qui sont généralement compris entre 1 et 10 $\mu\text{L}/\text{min}$,
- Un cycle de perfusion en alternance entre un débit de 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ pendant 30 secondes suivi d'un arrêt de la perfusion pendant 30 secondes, afin de laisser aux espèces le temps de diffuser à travers les pores.

Le choix de ces paramètres de perfusion sera justifié dans la partie Discussion de ce manuscrit.

2. Evaluation des effets de la perfusion sur le modèle FlowSkin

2.1 Caractérisation de la diffusion

Dans le but de caractériser le modèle perfusé, la première étape a consisté à évaluer la diffusion des espèces dans le modèle FlowSkin perfusé à un débit moyen de 2,5 $\mu\text{L}/\text{min}$, le cycle de perfusion appliqué étant de 30 secondes à un débit de 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ suivies de 30 secondes sans perfusion. Pour ce faire, les différentes méthodes d'analyse développées et décrites dans la Partie 2 de ce manuscrit ont été appliquées au modèle FlowSkin.

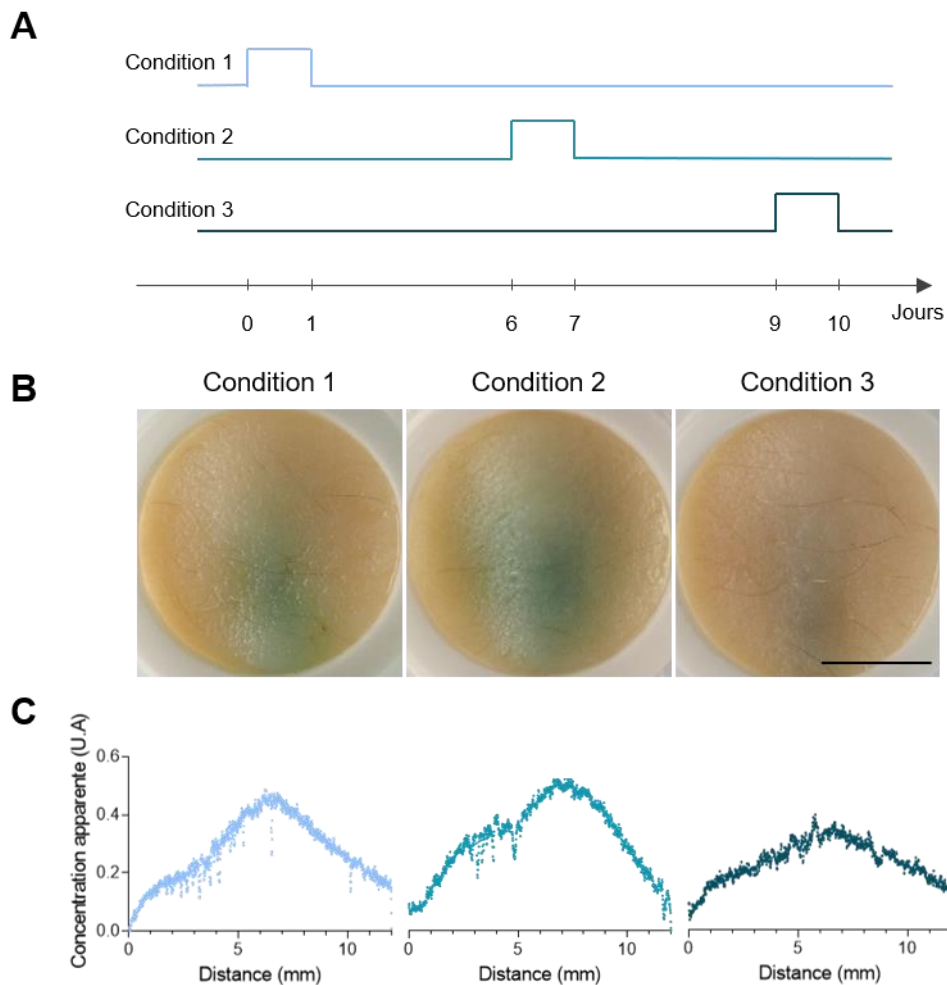


Figure 56. Evolution de la diffusion dans le modèle FlowSkin sur 10 jours de culture. Des modèles FlowSkin issus d'un même donneur ont été perfusés pendant 10 jours avec du milieu de culture à un débit moyen de $2,5 \mu\text{L}/\text{min}$ ($5 \mu\text{L}/\text{min}$ pendant 30 secondes puis arrêt de la perfusion pendant 30 secondes). **(A)** Un colorant alimentaire bleu à 0,5 % (poids/volume) dans du PBS, a été perfusé pendant 24 heures, entre Jour 0 et Jour 1 (Condition 1), Jour 6 et Jour 7 (Condition 2) ou Jour 9 et Jour 10 (Condition 3). **(B)** A l'issue des 24 heures de perfusion avec du colorant, des photos de la surface des modèles ont été prises. Barre d'échelle : 1 cm. **(C)** Les graphes présentent la concentration apparente en colorant à la surface des modèles selon un axe centré sur la biopsie, perpendiculaire à l'axe d'implantation du cathéter, pour chaque temps de cinétique. Ces graphes ont été obtenus grâce à la mesure des intensités de coloration à la surface de la peau, tel que décrit dans le paragraphe 4.1.2.b de la partie Matériel & Méthodes de ce manuscrit.

2.1.1. Analyse macroscopique et qualitative de la diffusion dans le modèle perfusé

Une première analyse macroscopique de la diffusion a été réalisée. Pour cela, du colorant alimentaire à 0,5 % (poids/volume) dans du PBS a été perfusé via le dispositif microporeux pendant 24 heures (**Figure 55**).

Les images de la surface de la peau réalisée à différents temps de cinétique montrent une coloration progressive de l'explant depuis le cathéter vers la périphérie de la biopsie (**Figure 55.A**). La mesure de la concentration apparente en colorant réalisée sur un axe perpendiculaire au cathéter démontre l'augmentation de la concentration au cours du temps, suggérant une accumulation du colorant dans le tissu (**Figure 55.B**).

Afin d'évaluer l'évolution de cette diffusion au cours de la culture du modèle de peau, des modèles ont été perfusés pendant dix jours avec du milieu de culture. Du colorant a été perfusé via le dispositif poreux à différents temps (**Figure 56.A**) :

- Entre Jour 0 et Jour 1 (Condition 1),
- Entre Jour 6 et Jour 7 (Condition 2),
- Entre Jour 9 et Jour 10 (Condition 3).

Les images de la surface de la peau réalisées à ces différents temps semblent révéler une diminution des échanges entre le flux et le tissu au cours du temps, notamment pour la condition 3 : l'intensité de coloration semble beaucoup plus faible que pour les conditions 1 et 2 (**Figure 56.B**).

Les mesures de la concentration apparente en colorant à la surface de la peau semblent confirmer ces observations : la concentration est relativement similaire pour les conditions 1 et 2, avec une concentration apparente en colorant dans la peau maximale d'environ 0,5 U.A. En revanche, pour la condition 3, la concentration diminue fortement et n'atteint que 0,3 U.A à son maximum (**Figure 56.C**).

L'analyse macroscopique de la diffusion d'un colorant dans le modèle perfusé démontre une perfusion efficace avec une accumulation du fluide dans le tissu, jusqu'à sept jours de culture. En revanche, les capacités d'échanges entre le flux et le tissu semble diminuer en fin de culture.

2.1.2. Analyse de la diffusion en temps réel dans le modèle perfusé

Afin de confirmer les résultats observés lors de la perfusion d'un colorant, les modèles FlowSkin ont été imagés en radiographie à rayons X (**Figure 57**). Dans cette approche, la radiographie permet d'obtenir une cartographie de la distribution de l'agent de contraste en projection, c'est-à-dire sur la totalité de l'épaisseur de la biopsie. Ces mesures ne peuvent donc pas être directement corrélées aux expériences réalisées avec le colorant, pour lesquelles l'observation ne se faisait qu'à la surface de la biopsie.

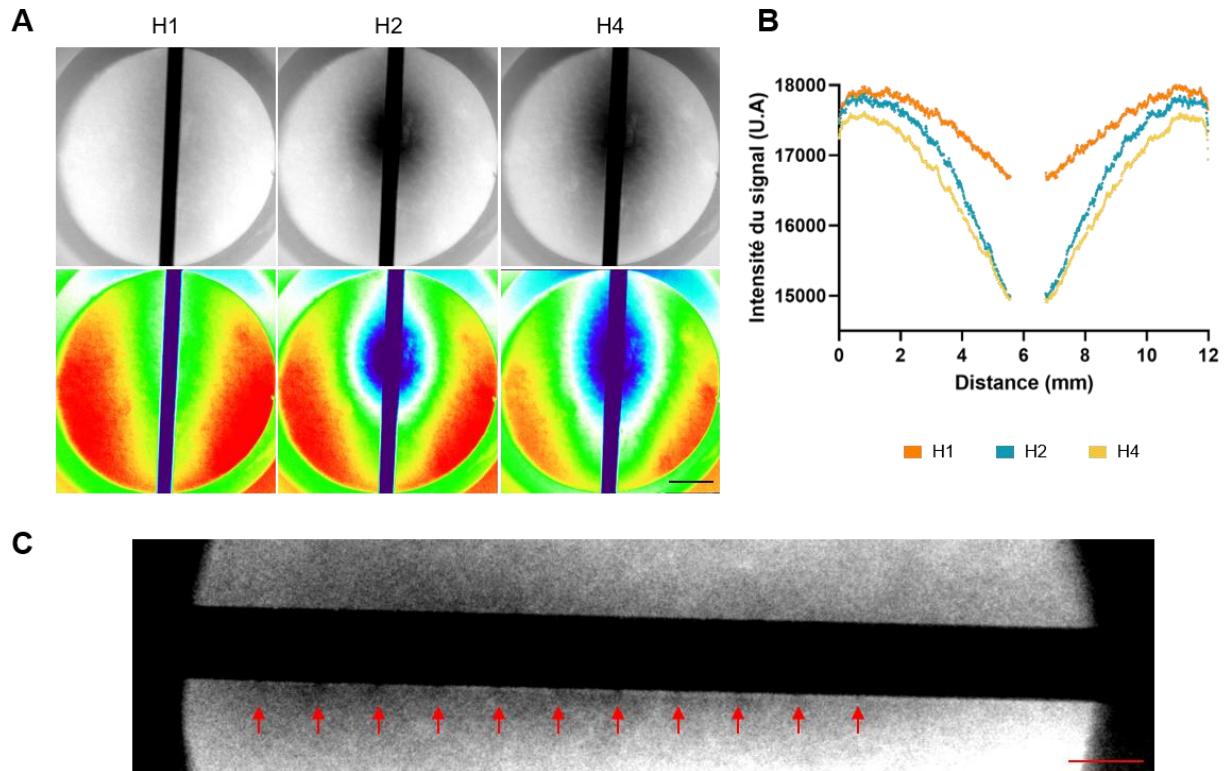


Figure 57. Evaluation en temps réel de la diffusion d'un agent de contraste (KI) de faible poids moléculaire dans le modèle FlowSkin. Des modèles FlowSkin ont été perfusés pendant 4 heures avec un agent de contraste de faible poids moléculaire (166 Da) : de l'iodure de potassium (KI) à 0,5 g/mL dans du PBS, à un débit moyen de 2,5 $\mu\text{L}/\text{min}$ (5 $\mu\text{L}/\text{min}$ pendant 30 secondes puis arrêt de la perfusion pendant 30 secondes). Sa diffusion dans la peau a été étudiée par radiographie à rayons X. **(A)** Une radiographie du modèle de peau vue de dessus est présentée pour trois temps de cinétique : 1 heure, 2 heures et 4 heures de perfusion. Les images sont présentées en niveau de gris (en haut) avec le KI en noir, et en dégradés de couleurs (en bas) avec le KI en bleu. Barre d'échelle : 5 mm. **(B)** Le graphe présente les intensités du signal mesurées suivant un axe perpendiculaire au cathéter, au centre de l'image, pour chaque temps de cinétique. **(C)** Zoom sur le cathéter. Les flèches rouges désignent la position des pores. Barre d'échelle : 1 mm.

Les résultats obtenus révèlent une diffusion de l'agent de contraste perfusé dans le tissu durant les premières heures de culture (**Figure 57.A**). Une vue zoomée sur le cathéter permet de visualiser la diffusion du KI à travers chaque pore, confirmant bien qu'il y a une communication entre le perfusé et le tissu à ce niveau-là (**Figure 57.C**). Les échanges semblent cependant localisés au niveau d'une fraction du cathéter, de l'ordre de 6 mm, alors que la zone poreuse du dispositif microporeux a une longueur de 10 mm. Les échanges ne semblent donc pas efficaces à travers tous les pores du cathéter.

La mesure de l'intensité du signal selon un axe perpendiculaire à l'axe d'implantation du cathéter confirme les résultats observés lors de la perfusion de colorant : le fluide perfusé s'accumule dans le tissu, suggérant une augmentation de la concentration en agent de contraste au cours du temps (**Figure 57.B**).

L'analyse du modèle FlowSkin en radiographie à rayons X démontre qu'il y a bien une communication entre le perfusé et le tissu au niveau des pores, et une accumulation des espèces perfusées dans le tissu au cours du temps. Cependant, elle semble indiquer que la diffusion n'est pas efficace par tous les pores du cathéter.

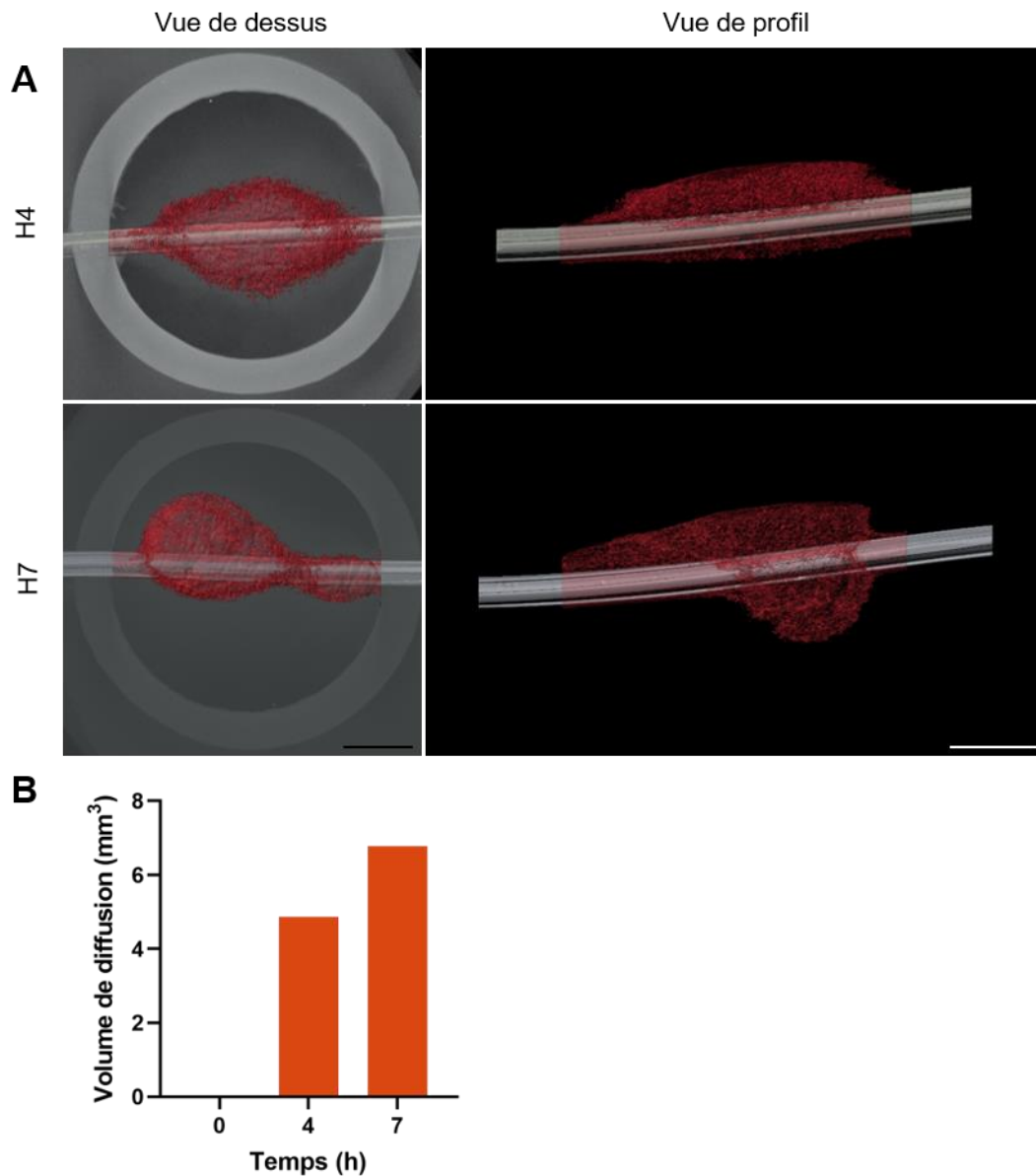


Figure 58. Evaluation en trois dimensions de la diffusion d'un agent de contraste de faible poids moléculaire dans le modèle FlowSkin. Des modèles FlowSkin ont été perfusés pendant 4 et 7 heures avec un agent de contraste de faible poids moléculaire (166 Da) : de l'iodure de potassium (KI) à 0,5 g/mL, à un débit moyen de 2,5 $\mu\text{L}/\text{min}$ (5 $\mu\text{L}/\text{min}$ pendant 30 secondes puis arrêt de la perfusion pendant 30 secondes). Sa diffusion dans la peau a été étudiée par tomographie à rayons X. Une reconstruction 3D a été réalisée à l'aide du logiciel Imaris. **(A)** Pour chaque temps de cinétique, une vue de dessus et une vue de profil est présentée. Le KI est représenté en rouge. Barre d'échelle : 3 mm. **(B)** Le graphe présente le volume de diffusion mesuré pour chaque temps de cinétique.

2.1.3. Analyse de la diffusion en 3 dimensions dans le modèle perfusé

Dans le but de visualiser le profil de diffusion en trois dimensions, le modèle FlowSkin a été imagé en tomographie à rayons X (**Figure 58**).

La reconstruction 3D du volume de diffusion extraite des données acquises par tomographie à rayons X a été réalisée en fixant un seuil arbitraire d'intensité du signal, permettant de représenter au mieux le volume de diffusion observé, et en cohérence avec le profil de diffusion observé en surface sur les expériences de perfusion de colorant bleu à des temps similaires. La reconstruction obtenue montre une répartition de l'agent de contraste relativement homogène autour du cathéter après 4 heures de culture (**Figure 58.A**). Après 7 heures de perfusion, l'agent de contraste semble diffuser dans toute l'épaisseur de la biopsie, mais principalement à partir d'une zone localisée du cathéter.

Les volumes de diffusion mesurés à partir de la reconstruction 3D du modèle FlowSkin montrent une accumulation de l'agent de contraste dans le tissu au cours du temps (**Figure 58.B**).

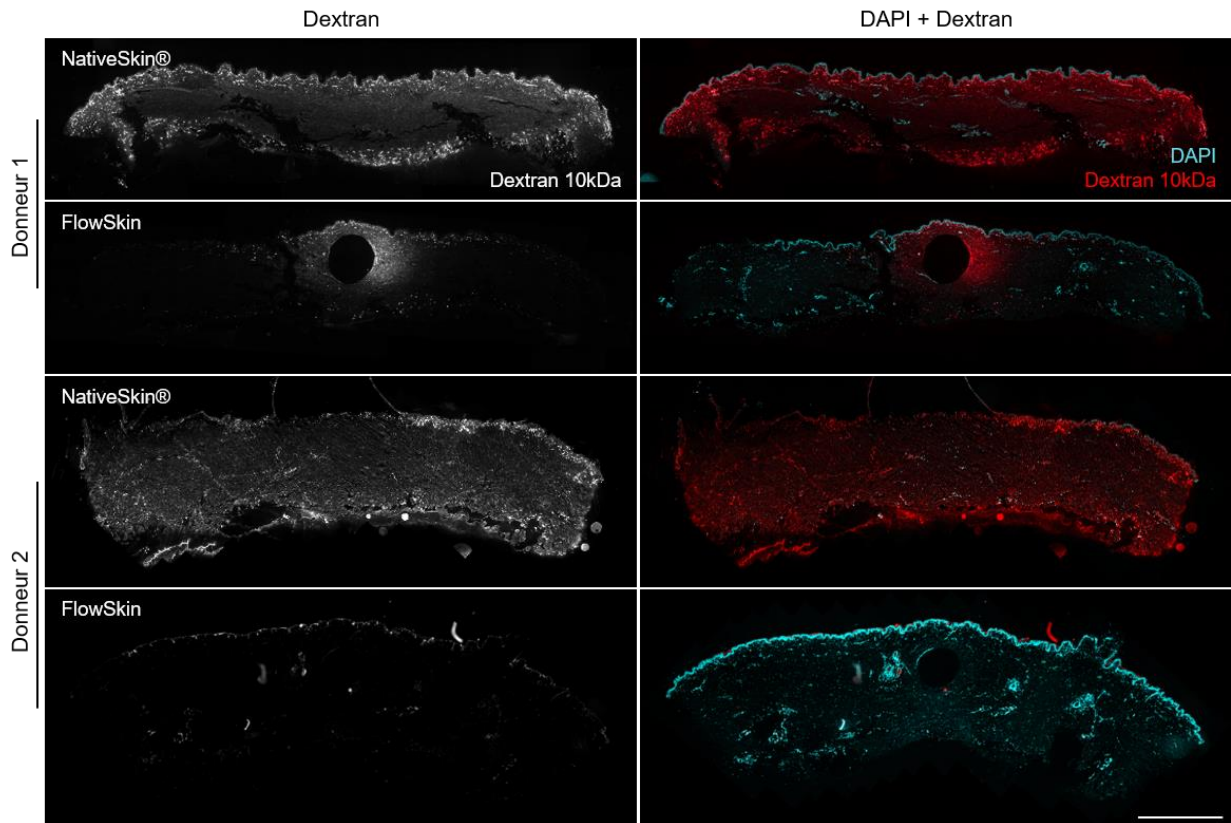


Figure 59. Evaluation de la diffusion d'un dextran de 10 kDa dans des modèles de peau après 24 heures de culture. Un dextran de 10 kDa à 0,08 mg/mL couplé à de l'Alexa Fluor 647 (blanc à gauche, rouge à droite) a été administré dans des modèles de peau : en diffusion passive pour les modèles NativeSkin®, ou par perfusion pour les modèles FlowSkin, à un débit moyen de 2,5 $\mu\text{L}/\text{min}$ (5 $\mu\text{L}/\text{min}$ pendant 30 secondes puis arrêt de la perfusion pendant 30 secondes). Les modèles ont été cultivés pendant 24 heures. A l'issue de la culture, les modèles ont été fixés en formaline et inclus en paraffine (Donneur 1), ou inclus en OCT et congelés à -80°C (Donneur 2). Un contre-marquage au DAPI (cyan) a été réalisé sur des coupes de 5 μm d'épaisseur. Une photo représentative est présentée pour chaque condition et pour chaque donneur. Barre d'échelle : 2 mm.

2.1.4. Analyse de la diffusion de dextrans fluorescents de différents poids moléculaires dans le modèle perfusé

La diffusion de composés de différents poids moléculaires a été étudiée dans le modèle FlowSkin. Pour cela, des dextrans fluorescents de 10 et 70 kDa ont été perfusés dans le tissu via le cathéter microporeux. Les modèles ont été cultivés pendant 24 heures. L'expérience a été réalisée sur deux donneurs indépendants. Une photo représentative de chaque donneur est présentée, pour chacun des dextrans utilisés (**Figures 59 et 60**). Les résultats ont été confrontés à ceux obtenus pour des modèles NativeSkin® contrôles.

a. Diffusion d'un dextran de 10kDa

Après 24 heures de perfusion, un signal diffus localisé autour du cathéter est visible pour le premier donneur, suggérant la diffusion du dextran de 10 kDa à travers les pores du cathéter (**Figure 59**). Le signal semble plus intense au centre du modèle perfusé qu'au centre du modèle NativeSkin®, suggérant une concentration en dextran plus importante au cœur du tissu dans le cas du modèle FlowSkin. En revanche, peu de signal est visible en périphérie du modèle, tandis que le signal semble diffus dans toute la biopsie dans le cas du modèle NativeSkin®.

De façon surprenante, les résultats obtenus pour le premier donneur ne sont pas retrouvés pour le Donneur 2 : très peu de signal est visible autour du cathéter, suggérant que le dextran de 10 kDa n'a que très peu diffusé par les pores du cathéter (**Figure 59**). En revanche, pour le modèle NativeSkin®, un signal intense est observable dans toute la biopsie, comme pour le premier Donneur, confirmant la fluorescence du dextran de 10 kDa.

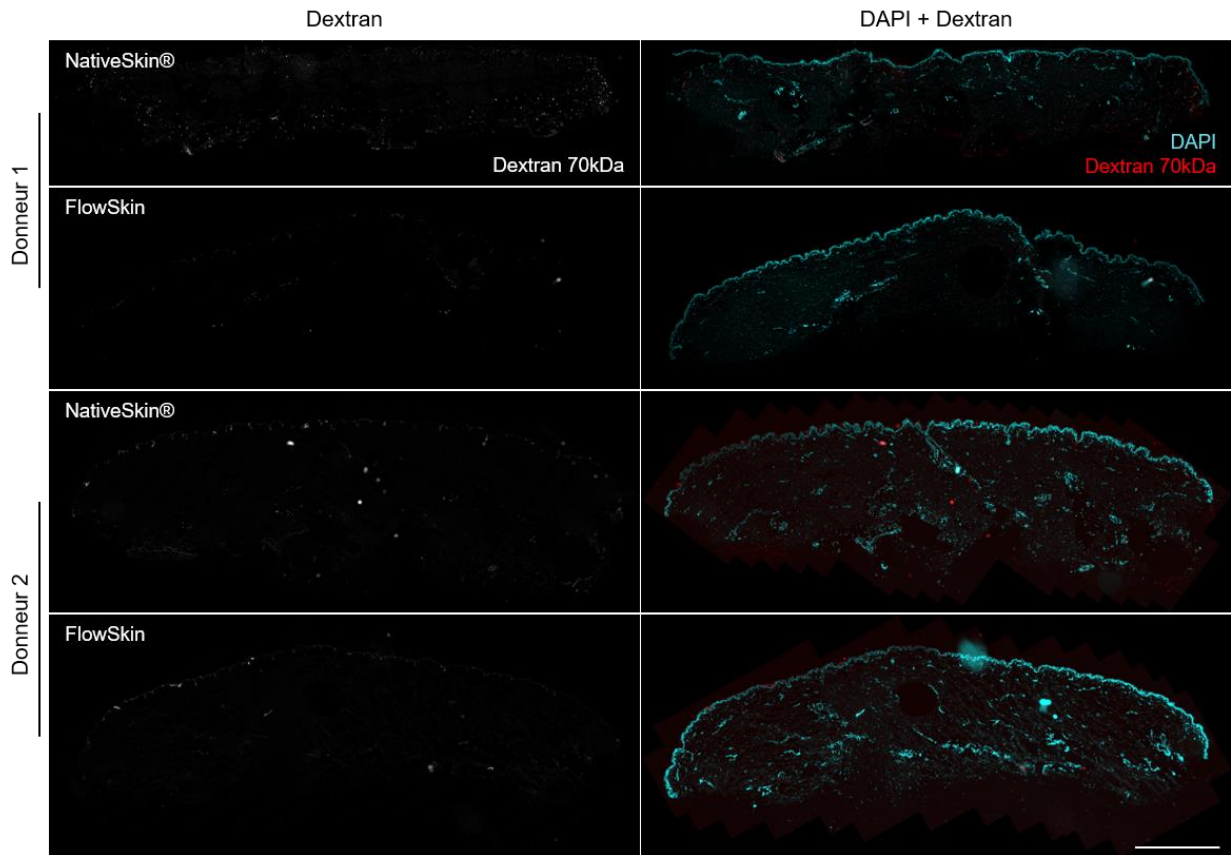


Figure 60. Evaluation de la diffusion d'un dextran de 70 kDa dans des modèles de peau après 24 heures de culture. Un dextran de 70 kDa à 0,08 mg/mL couplé à du Texas Red (blanc à gauche, rouge à droite) a été administré dans des modèles de peau : en diffusion passive pour les modèles NativeSkin®, ou par perfusion pour les modèles FlowSkin, à un débit moyen de 2,5 $\mu\text{L}/\text{min}$ (5 $\mu\text{L}/\text{min}$ pendant 30 secondes puis arrêt de la perfusion pendant 30 secondes). Les modèles ont été cultivés pendant 24 heures. A l'issue de la culture, les modèles ont été fixés en formaline et inclus en paraffine (Donneur 1), ou inclus en OCT et congelés à -80°C (Donneur 2). Un contre-marquage au DAPI (cyan) a été réalisé sur des coupes de 5 μm d'épaisseur. Une photo représentative est présentée pour chaque condition et pour chaque donneur. Barre d'échelle : 2 mm.

b. Diffusion d'un dextran de 70kDa

Après 24 heures de perfusion, très peu de signal est visible, que ce soit pour les modèles perfusés ou les modèles NativeSkin®, suggérant que le dextran de 70kDa diffuse peu à travers les pores du cathéter, et à travers la matrice des modèles de peau (**Figure 60**).

Les résultats de ces analyses mettent en évidence deux points. Premièrement, il semble y avoir un manque de reproductibilité dans les expériences de perfusion des modèles de peau entraînant une importante variabilité entre les différents donneurs. Deuxièmement, les composés de haut poids moléculaire ne semblent pas ou peu diffuser à travers les pores du cathéter.

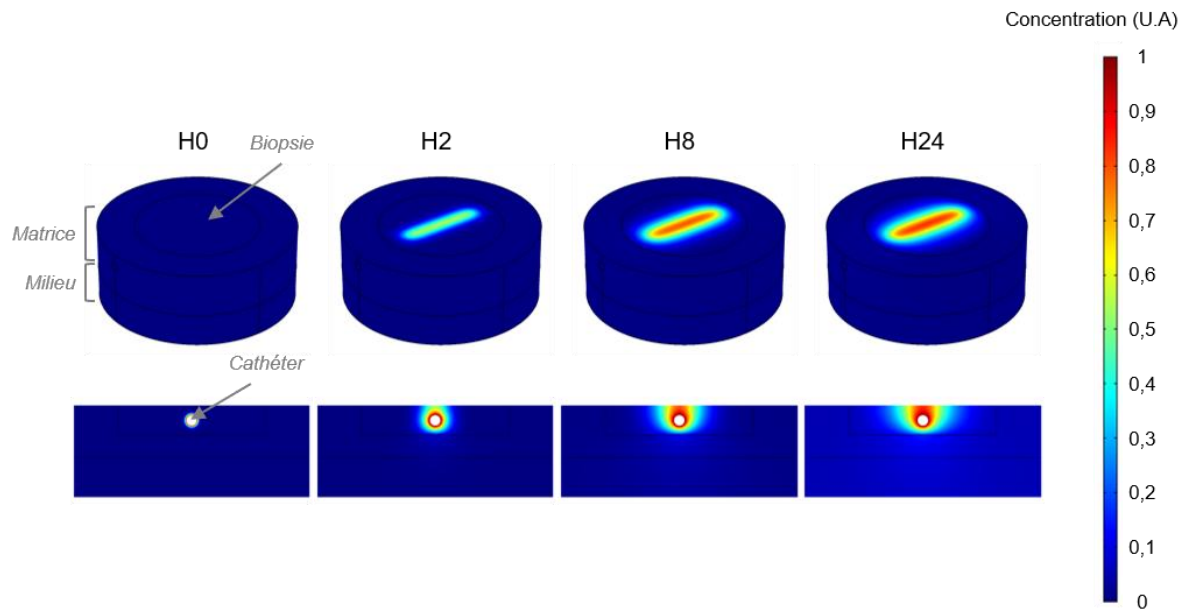


Figure 61. Simulation de la diffusion d'un composé perfusé via le cathéter microporeux dans le modèle FlowSkin. La diffusion d'un composé d'environ 1 kDa perfusé dans le modèle FlowSkin via le cathéter poreux a été simulée à l'aide du logiciel COMSOL. Une vue d'ensemble et une vue en coupe selon un axe perpendiculaire à la surface de la biopsie sont présentées, à différents temps de cinétique. La solution perfusée a une concentration arbitraire de 1 U.A. La matrice et le milieu de culture ont une concentration initiale en composé égale à 0 U.A. Les coefficients de diffusion utilisés pour la simulation sont les suivants : $9,3 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$ pour le coefficient de diffusion du composé dans la peau, $1,4 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$ pour le coefficient de diffusion du composé dans la matrice et $2 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$ pour le coefficient de diffusion du composé dans le milieu de culture.

2.1.5. Simulation informatique de la diffusion dans le modèle FlowSkin

La diffusion d'un composé d'environ 1 kDa, administré dans le tissu par perfusion à une concentration arbitraire de 1 U.A a été simulée à l'aide du logiciel COMSOL. Cette modélisation s'est appuyée sur les coefficients de diffusion mesurés pour le colorant alimentaire (**Résultats Partie 2, Paragraphe 1**). La méthode utilisée pour le développement de ce modèle est détaillée dans la partie Matériel & Méthodes de ce manuscrit, Paragraphe 5. Il est tout de même important de noter qu'afin de faciliter la simulation, la zone poreuse du cathéter a été modélisée comme un cylindre rempli de liquide, à une concentration constante dans le temps et égale à la concentration initiale de 1 U.A. Les résultats de la simulation sont présentés pour différents temps de cinétique (**Figure 61**).

a. Diffusion d'un composé perfusé dans le tissu

Les résultats obtenus montrent une diffusion rapide des espèces du flux vers le tissu : après 2 heures de perfusion, un front de diffusion est visible autour du cathéter (**Figure 61**). Ce front se déplace progressivement vers la périphérie de la biopsie. Une déplétion des espèces du tissu vers la matrice est visible dès 8 heures de culture et semble s'intensifier au cours du temps : après 24 heures de culture, la concentration en composé dans le milieu et dans la matrice semble être homogène et équivalente à la concentration en composé en périphérie de la biopsie qui est de l'ordre de 0,2 U.A.

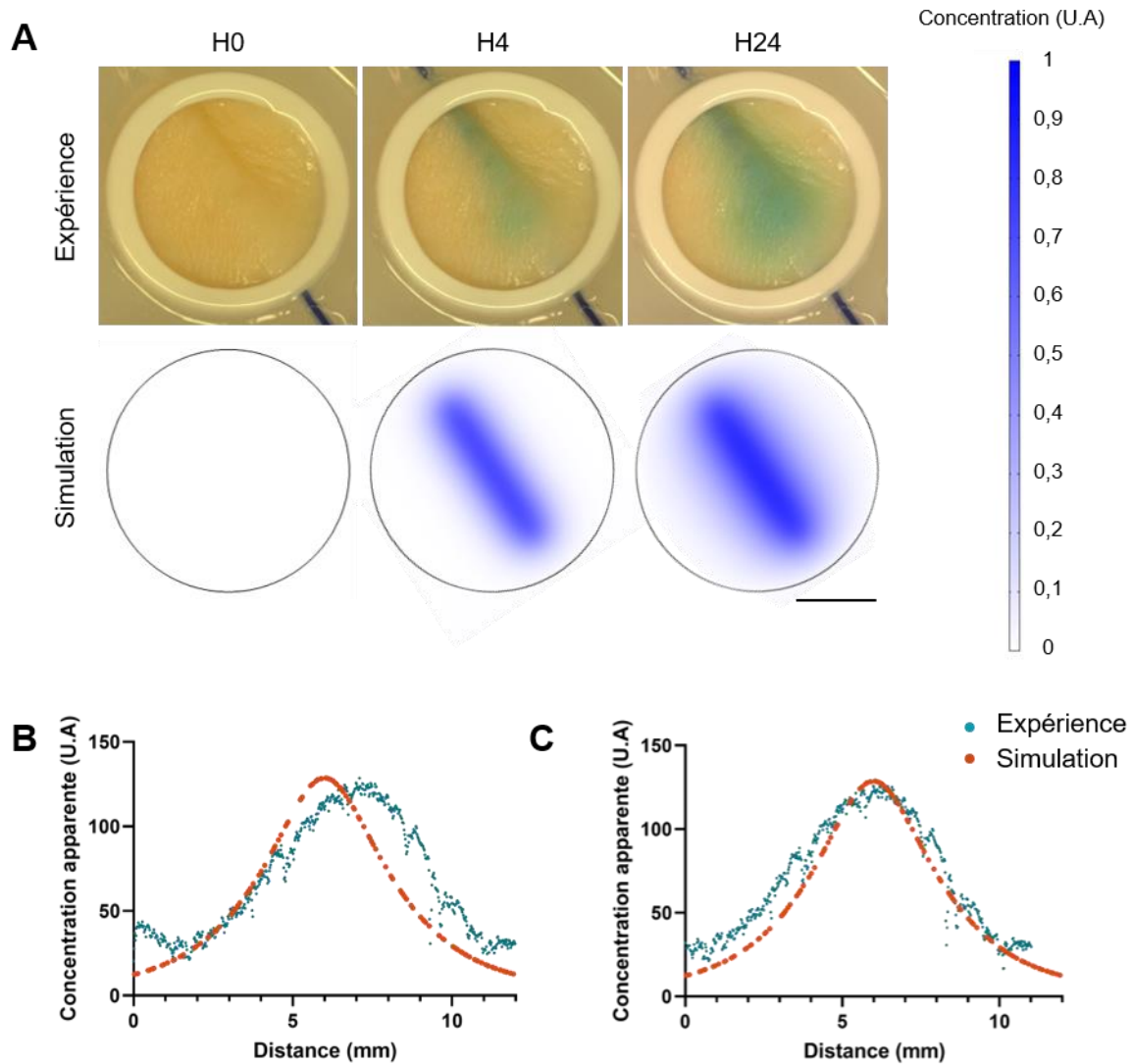


Figure 62. Comparaison entre la simulation de la diffusion dans le modèle FlowSkin et les résultats expérimentaux. (A) Analyse macroscopique de la diffusion du colorant à la surface de la peau pour différents temps de cinétique, pour l'expérience et pour la simulation. Barre d'échelle : 5 mm. **(B)** Le graphe présente la concentration apparente en colorant à la surface du modèle selon un axe centré sur la biopsie, perpendiculaire à l'axe d'implantation du cathéter, après 24 heures de culture, pour l'expérience et pour la simulation. **(C)** Graphe obtenu après décalage en X des données expérimentales, afin d'aligner la zone du cathéter avec celle de la simulation.

b. Comparaison entre la simulation et l'expérience

Le modèle numérique développé sur COMSOL afin de simuler la diffusion dans des explants de peau ayant été validé en comparant les résultats de la simulation aux résultats expérimentaux pour une biopsie en flottaison, la simulation peut maintenant permettre de vérifier que les résultats expérimentaux obtenus sur des modèles plus complexes sont bien ceux attendus.

Des images de la diffusion du colorant à la surface des modèles obtenues par simulation ont été comparées à celles obtenues expérimentalement et présentées précédemment, pour différents temps (**Figure 62.A**).

Visuellement, les profils de diffusion semblent relativement similaires. Une différence notable est le manque d'homogénéité de la diffusion le long du cathéter observé pour l'expérience.

Afin de comparer quantitativement les données, la courbe de la concentration à la surface de la peau suivant un axe perpendiculaire à l'axe de l'implantation du cathéter a été extraite de la modélisation numérique, et comparée à la courbe expérimentale (**Figure 62.B**). Les résultats obtenus montrent un décalage entre les deux courbes, dû au fait que le cathéter n'est pas implanté parfaitement au centre de la biopsie.

Un décalage en x de la courbe expérimentale a donc été effectué afin de comparer les deux profils de diffusion sans prendre en compte la position du cathéter dans la biopsie (**Figure 62.C**). Le graphe obtenu révèle des profils de diffusion relativement similaires pour la simulation et pour l'expérience, suggérant que, pour le modèle étudié, la perfusion du colorant via le dispositif microporeux est efficace et conforme aux résultats attendus. Ces résultats permettent également de confirmer que le modèle numérique basé sur la loi de Fick et sur les écoulements laminaires au sein du cathéter décrit fidèlement les observations expérimentales et offre ainsi une valeur prédictive.

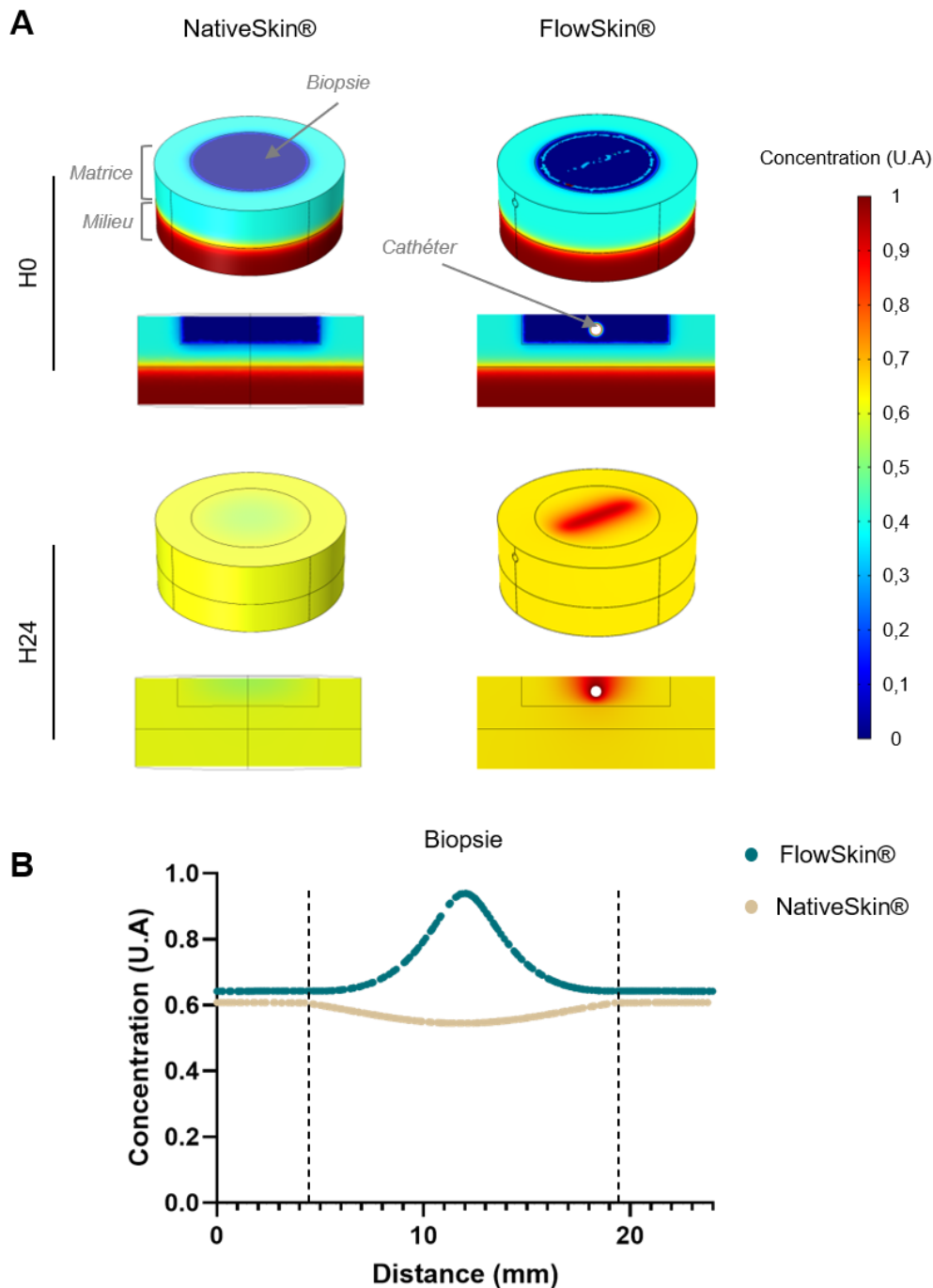


Figure 63. Comparaison entre les simulations des modèles NativeSkin® et FlowSkin. (A) La diffusion d'un composé d'environ 1 kDa dans le modèle NativeSkin® et dans le modèle FlowSkin a été simulée à l'aide du logiciel COMSOL. A l'état initial, ce composé est présent à la fois dans le milieu de culture à une concentration arbitraire égale à 1 U.A (rouge foncé), et dans la matrice à une concentration égale à 0,4 U.A (cyan). Dans le modèle FlowSkin, le composé est également présent dans le flux à une concentration constante égale à 1 U.A (rouge foncé). Cette configuration est représentative de la diffusion du milieu de culture administré à la fois par diffusion passive et par perfusion. Une vue d'ensemble et une vue en coupe selon un axe perpendiculaire à la surface de la biopsie sont présentées, à l'état initial et après 24 heures de culture. Les coefficients de diffusion utilisés pour la simulation sont les suivants : $9,3 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$ pour le coefficient de diffusion du composé dans la peau, $1,4 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$ pour le coefficient de diffusion du composé dans la matrice et $2 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$ pour le coefficient de diffusion du composé dans le milieu de culture. (B) Le graphe présente la concentration en colorant à la surface du modèle selon un axe centré sur la biopsie, perpendiculaire à l'axe d'implantation du cathéter, après 24 heures de culture.

c. Comparaison entre le modèle NativeSkin® et le modèle FlowSkin

La modélisation numérique permet également de comparer différentes voies d'administration d'un composé et de choisir la plus efficace et la plus adaptée selon l'application souhaitée.

Afin d'évaluer l'intérêt de la perfusion intra-tissulaire pour améliorer l'approvisionnement en molécules d'intérêt au cœur du tissu, deux simulations ont été comparées (**Figure 63**) :

- La simulation de la diffusion dans le modèle NativeSkin® d'un composé présent initialement dans le milieu de culture (1 U.A) et dans la matrice (0,4 U.A). Ce milieu de culture est renouvelé tous les jours.
- La simulation de la diffusion dans le modèle FlowSkin d'un composé présent initialement dans le milieu de culture (1 U.A), dans la matrice (0,4 U.A) et perfusé en continu à une concentration égale à 1 U.A.

Les simulations obtenues à 0 et 24 heures de culture sont présentées pour les deux conditions (**Figure 63.A**). Les résultats montrent une diffusion du composé dans les trois compartiments (milieu de culture, matrice et biopsie) pour les deux conditions. Cependant, la concentration semble plus élevée pour le modèle perfusé que pour le modèle NativeSkin® dans l'ensemble du modèle, et principalement au centre de l'explant de peau.

Les mesures de la concentration à la surface de la peau suivant un axe perpendiculaire à l'axe d'implantation du cathéter confirment ces résultats (**Figure 63.B**). Après 24 heures de culture, la concentration maximale en composé dans le tissu est d'environ 1 U.A pour le modèle FlowSkin, contre 0,6 U.A pour le modèle NativeSkin®.

La modélisation numérique de la diffusion dans le modèle FlowSkin permet de démontrer la pertinence théorique de la perfusion du modèle de peau *ex vivo* afin d'améliorer l'approvisionnement du tissu, en comparaison avec la diffusion passive qui a lieu à travers la membrane poreuse de l'insert de culture dans le cas du modèle NativeSkin®.

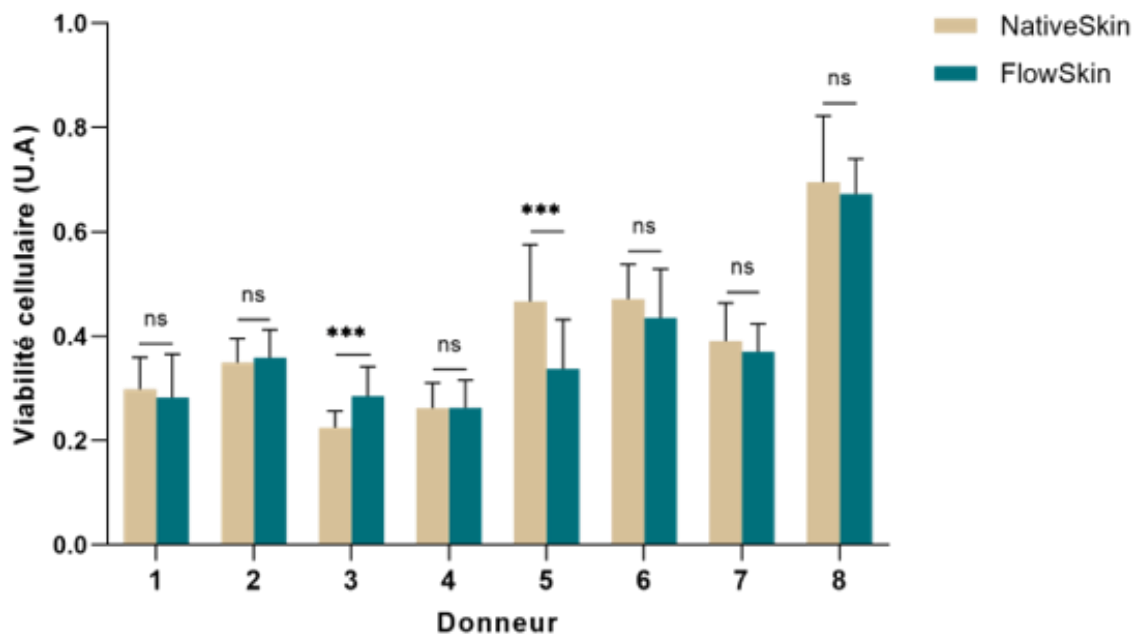


Figure 64. Evaluation de l'impact de la perfusion sur la viabilité des modèles de peau. Des modèles FlowSkin ont été perfusés pendant 10 jours, à un débit moyen de 2,5 $\mu\text{L}/\text{min}$ (5 $\mu\text{L}/\text{min}$ pendant 30 secondes puis arrêt de la perfusion pendant 30 secondes). L'expérience a été réalisée sur 8 donneurs indépendants, en duplicats (Donneurs 1 à 2 et 6 à 8) ou en quadruplicats (Donneurs 3 à 5). Des modèles NativeSkin® ont également été cultivés pendant 10 jours, et ont servi de condition contrôle. A l'issue de la culture, six biopsies de 2 mm de diamètre ont été produites dans chaque modèle. Un test de viabilité au WST-8 a été réalisé à partir de ces biopsies fraîches. Le graphe présente la moyenne et l'écart-type de la viabilité des répliquats pour chaque condition et pour chaque donneur. Un test statistique de Mann-Whitney a été réalisé. ns : $p > 0,05$; * : $p \leq 0,05$; ** : $p \leq 0,01$; *** : $p \leq 0,001$.

2.2 Evaluation des effets de la perfusion sur la physiologie de la peau

La seconde étape a consisté à évaluer l'impact de la perfusion sur la physiologie des modèles de peau. Pour cela, des modèles FlowSkin ont été perfusés avec du milieu de culture pendant 10 jours, à un débit moyen de 2,5 µL/min, le cycle de perfusion appliqué étant de 30 secondes à un débit de 5 µL/min suivies de 30 secondes sans perfusion. L'expérience a été réalisée sur huit donneurs indépendants, en duplicats (Donneurs 1 à 2 et 6 à 8) ou en quadruplicats (Donneurs 3 à 5). A l'issue des dix jours de culture, des analyses histologiques ont été réalisées :

- L'évaluation de la structure et de l'intégrité de la peau à l'aide d'une coloration à l'Hématoxyline et à l'Eosine,
- L'évaluation de la prolifération cellulaire grâce à un immunomarquage anti-Ki67,
- L'évaluation de l'apoptose cellulaire grâce à un immunomarquage anti-Caspase-3 active.

Pour chacun de ces paramètres, les résultats obtenus sur un réplicat représentatif sont présentés pour chacune des deux couches de la peau (épiderme et derme) et en deux zones distinctes : la périphérie de l'explant et le centre du modèle, au niveau de la zone d'implantation du cathéter.

Des analyses biochimiques ont également été réalisées :

- L'évaluation de la viabilité cellulaire par test colorimétrique au WST-8 réalisé sur des échantillons de 2 mm de diamètre, prélevés au sein des modèles de peau,
- L'étude du métabolisme cellulaire par dosage de la consommation en glucose et de la production de lactate dans le milieu de culture.

Pour chacune de ces analyses, la moyenne et l'écart-type des résultats obtenus sur l'ensemble des réplicats sont présentés, pour chaque donneur.

Les résultats sont comparés avec ceux obtenus pour des modèles NativeSkin® standards utilisés comme contrôles.

2.2.1. Impact de la perfusion sur la viabilité et l'intégrité de la peau

Afin d'évaluer la viabilité des cellules des modèles de peau après 10 jours de perfusion, un test colorimétrique au WST-8 a été réalisé.

Les résultats obtenus ne montrent aucune différence statistiquement significative en termes de viabilité entre les modèles NativeSkin® et les modèles FlowSkin, pour six donneurs sur les huit étudiés (**Figure 64**). En revanche, les modèles perfusés ont une viabilité statistiquement plus importante que les modèles NativeSkin® pour le troisième donneur, tandis que l'inverse est observé pour le cinquième donneur. De façon plus générale, la viabilité des modèles semble être relativement équivalente d'un donneur à l'autre, excepté pour le huitième donneur pour lequel la viabilité cellulaire semble plus élevée.

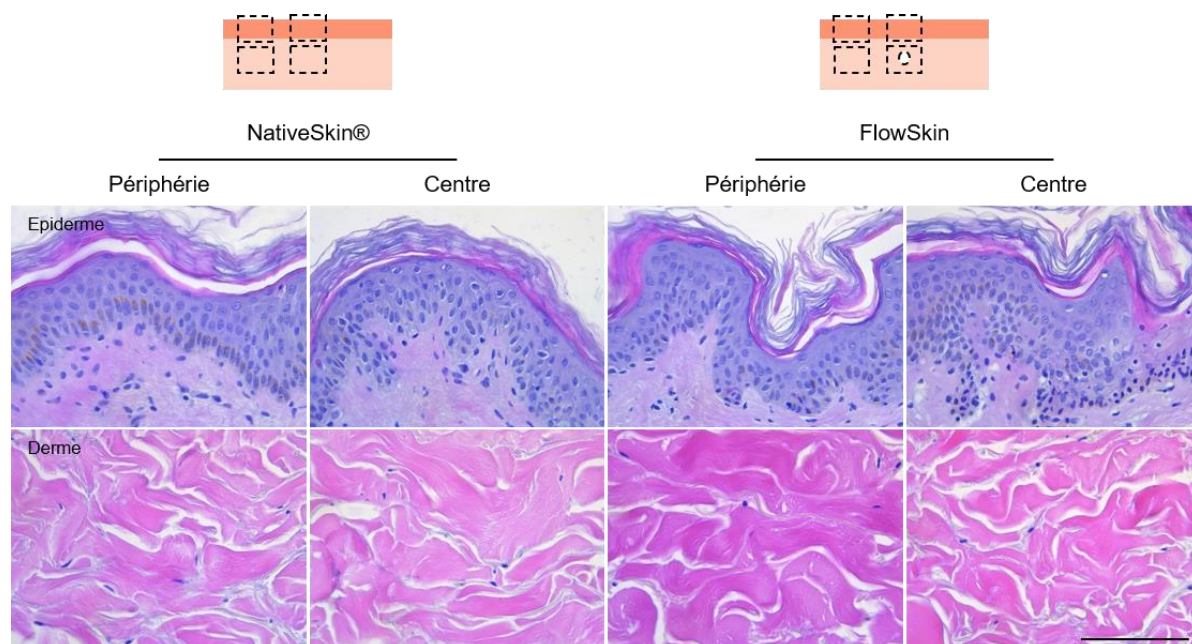


Figure 65. Evaluation de l'impact de la perfusion sur l'intégrité des modèles de peau. Des modèles FlowSkin ont été perfusés pendant 10 jours, à un débit moyen de 2,5 $\mu\text{L}/\text{min}$ (5 $\mu\text{L}/\text{min}$ pendant 30 secondes puis arrêt de la perfusion pendant 30 secondes). L'expérience a été réalisée sur 8 donneurs indépendants, en duplicats (Donneurs 1 à 2 et 6 à 8) ou en quadruplicats (Donneurs 3 à 5). Des modèles NativeSkin® ont également été cultivés pendant 10 jours, et ont servi de condition contrôle. A l'issue de la culture, les modèles ont été coupés en deux, perpendiculairement à l'axe d'implantation des cathéters dans le cas des modèles perfusés. Une moitié a été fixée en formaline et incluse en paraffine. Une coloration Hématoxyline et Eosine a été réalisée sur des coupes de 5 μm d'épaisseur. Une photo représentative de l'épiderme et du derme est présentée pour chaque condition, en deux zones différentes : en périphérie de la biopsie, et au centre de la biopsie, au niveau de la zone d'implantation du cathéter. Barre d'échelle : 100 μm .

La coloration Hématoxyline et Eosine réalisée sur les coupes des modèles NativeSkin® après 10 jours de culture révèle une structure de la peau normale (**Figure 65**) : les cellules de l'épiderme semblent cohésives, et aucun phénomène de pycnose, de spongiose ou de vacuolisation n'est observable, aussi bien au centre qu'à la périphérie des biopsies de peau. Au niveau du derme, les fibres de collagène semblent intègres, et quelques fibroblastes sont visibles.

Des résultats similaires sont observés à la périphérie des modèles FlowSkin, suggérant que la perfusion n'endommage pas le tissu au niveau de cette zone. Le derme des modèles de peau perfusés semble également intègre au centre des modèles. En revanche, des cellules pycnotiques sont visibles dans la couche basale de l'épiderme des modèles perfusés, au niveau de la zone d'implantation du cathéter. Cette étape irréversible de la mort cellulaire est caractérisée par la condensation et la rétraction de la chromatine des noyaux qui se colore de façon intense. Cette perte de l'intégrité de l'épiderme au niveau de la zone d'implantation des cathéters pourrait être due à la perfusion, ou bien à l'implantation du cathéter en elle-même. En effet, il a été démontré que l'implantation du cathéter ne semblait avoir que peu d'impact sur l'intégrité de la peau après 7 jours de culture (**Résultats Partie 1, Paragraphe 3**), mais cela n'a pas été étudié après 10 jours de culture.

Les résultats obtenus semblent démontrer la possibilité de perfuser des modèles de peau *ex vivo* pendant 10 jours sans altérer la viabilité cellulaire, en comparaison avec les modèles NativeSkin® contrôles, à l'exception du Donneur 5. Au niveau de l'intégrité du tissu, celle-ci semble être maintenue dans les modèles perfusés, à l'exception d'une légère mortalité cellulaire observée au niveau de la zone d'implantation du cathéter.

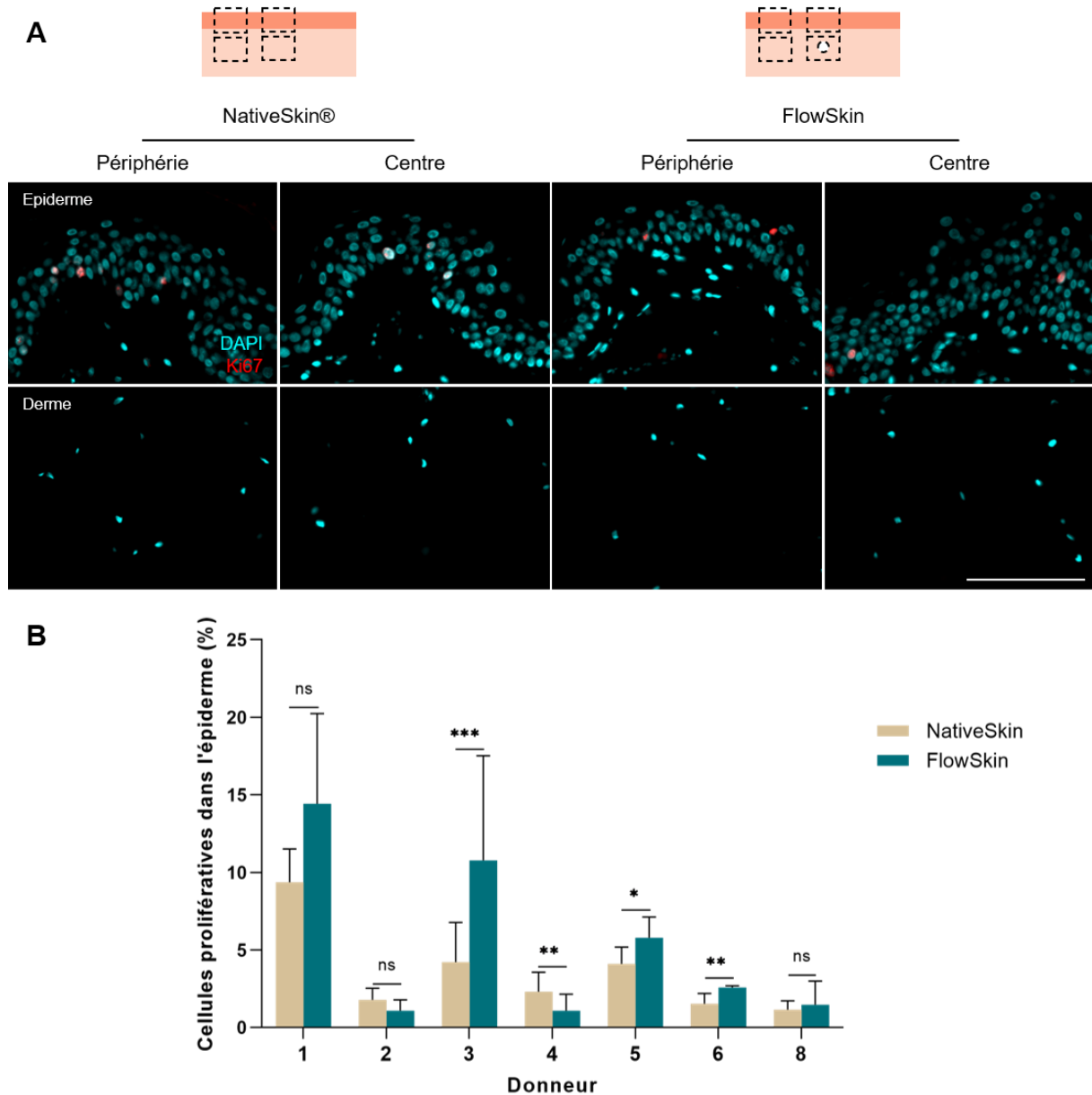


Figure 66. Evaluation de l'impact de la perfusion sur la prolifération cellulaire dans les modèles de peau. Des modèles FlowSkin ont été perfusés pendant 10 jours, à un débit moyen de 2,5 $\mu\text{L}/\text{min}$ (5 $\mu\text{L}/\text{min}$ pendant 30 secondes puis arrêt de la perfusion pendant 30 secondes). L'expérience a été réalisée sur 8 donneurs indépendants, en duplicats (Donneurs 1 à 2 et 6 à 8) ou en quadruplicats (Donneurs 3 à 5). Des modèles NativeSkin® ont également été cultivés pendant 10 jours, et ont servis de condition contrôle. A l'issue de la culture, les modèles ont été coupés en deux, perpendiculairement à l'axe d'implantation des cathéters dans le cas des modèles perfusés. Une moitié a été fixée en formaline et incluse en paraffine. Un immunomarquage anti-Ki67 a été réalisé sur des coupes de 5 μm d'épaisseur. **(A)** Une photo représentative de l'épiderme et du derme est présentée pour chaque condition, en deux zones différentes : en périphérie de la biopsie, et au centre de la biopsie, au niveau de la zone d'implantation du cathéter. Barre d'échelle : 100 μm . **(B)** Une quantification du pourcentage de cellules prolifératives a été réalisée sur 10 champs pour chaque réplicat. Le graphique présente la moyenne et l'écart-type des valeurs obtenues pour chaque condition et pour chaque donneur. Un test statistique de Mann-Whitney a été réalisé. ns : $p > 0,05$; * : $p \leq 0,05$; ** : $p \leq 0,01$; *** : $p \leq 0,001$.

2.2.2. Impact de la perfusion sur la prolifération cellulaire

Afin d'évaluer l'impact de la perfusion sur la prolifération cellulaire dans les modèles de peau, un immunomarquage anti-Ki67 a été réalisé.

Les résultats révèlent qu'aucune cellule du derme n'est positive au marqueur Ki67, aussi bien dans les modèles NativeSkin® que dans les modèles FlowSkin, suggérant qu'il n'y a pas de prolifération dans cette zone après 10 jours de culture (**Figure 66.A**). Au niveau de l'épiderme, des cellules prolifératives sont visibles, principalement dans la couche basale, pour les deux conditions. Aucune différence ne semble visible entre la périphérie et le centre des biopsies de peau.

Afin de vérifier ces observations, une quantification du pourcentage de cellules positives dans l'épiderme a été réalisée (**Figure 66.B**). Les résultats obtenus montrent un taux de prolifération dans l'épiderme variant d'environ 2 à 15 % selon les donneurs. Un pourcentage de prolifération statistiquement plus élevé pour les modèles perfusés que pour les modèles contrôles est observable pour trois donneurs sur les sept étudiés (Donneurs 3, 5 et 8). L'inverse est observé pour un donneur (Donneur 4). Aucune différence statistiquement significative n'est notable entre les deux conditions pour les trois autres donneurs.

Les résultats obtenus démontrent que la perfusion pendant 10 jours ne semble pas altérer la prolifération cellulaire dans les modèles de peau, en comparaison avec les modèles NativeSkin® contrôles. En revanche, il est difficile de conclure quant à une potentielle maintenance de la prolifération cellulaire due à la perfusion, en raison des fortes variabilités intra et inter donneurs observées.

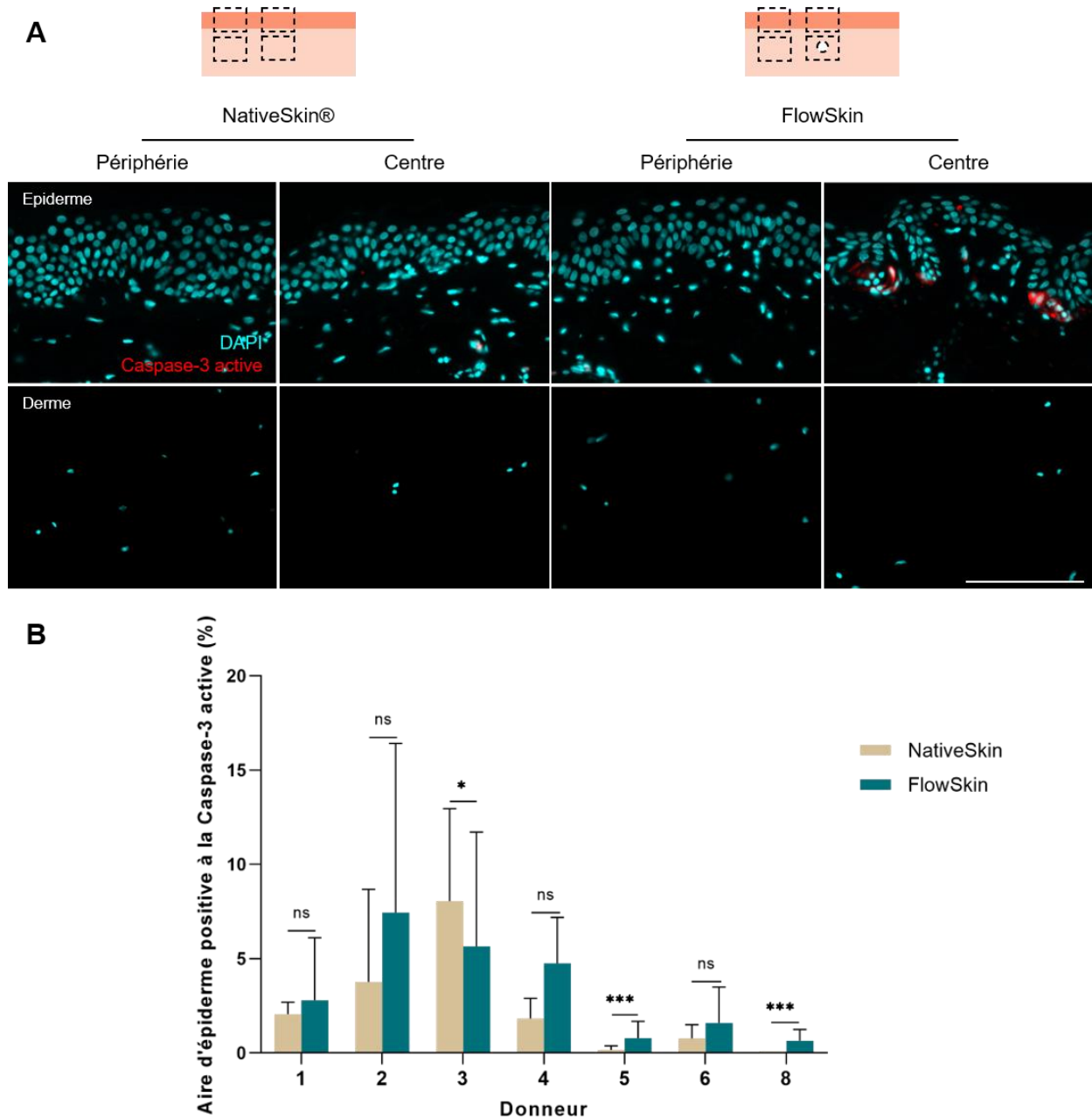


Figure 67. Evaluation de l'impact de la perfusion sur la mort cellulaire dans les modèles de peau.

Des modèles FlowSkin ont été perfusés pendant 10 jours, à un débit moyen de 2,5 $\mu\text{L}/\text{min}$ (5 $\mu\text{L}/\text{min}$ pendant 30 secondes puis arrêt de la perfusion pendant 30 secondes). L'expérience a été réalisée sur 8 donneurs indépendants, en duplicats (Donneurs 1 à 2 et 6 à 8) ou en quadruplicats (Donneurs 3 à 5). Des modèles NativeSkin® ont également été cultivés pendant 10 jours, et ont servi de condition contrôle. A l'issue de la culture, les modèles ont été coupés en deux, perpendiculairement à l'axe d'implantation des cathéters dans le cas des modèles perfusés. Une moitié a été fixée en formaline et incluse en paraffine. Un immunomarquage anti Caspase-3 active a été réalisé sur des coupes de 5 μm d'épaisseur. **(A)** Une photo représentative de l'épiderme et du derme est présentée pour chaque condition, en deux zones différentes : en périphérie de la biopsie, et au centre de la biopsie, au niveau de la zone d'implantation du cathéter. Barre d'échelle : 100 μm . **(B)** Une quantification du pourcentage d'aire positive à la Caspase-3 active dans l'épiderme a été réalisée sur 10 champs pour chaque réplikat. Le graphique présente la moyenne et l'écart-type des valeurs obtenues pour chaque condition et pour chaque donneur. Un test statistique de Mann-Whitney a été réalisé. ns : $p > 0,05$; * : $p \leq 0,05$; ** : $p \leq 0,01$; *** : $p \leq 0,001$.

2.2.3. Impact de la perfusion sur la mort cellulaire

Afin d'évaluer l'impact de la perfusion sur la mort cellulaire dans les modèles de peau, un immunomarquage anti-Caspase-3 active a été réalisé.

Les résultats montrent qu'aucune cellule du derme n'est positive au marqueur Caspase-3 active, aussi bien dans les modèles NativeSkin® que dans les modèles FlowSkin, suggérant qu'il n'y a pas de mort cellulaire dans cette zone après 10 jours de culture (**Figure 67.A**). Au niveau de l'épiderme, seulement quelques cellules positives sont visibles dans le modèle NativeSkin®. Aucune différence significative n'est observée entre la périphérie et le centre du modèle.

Dans le modèle FlowSkin, une mort cellulaire plus importante est notable au centre du modèle, au niveau de la zone d'implantation du cathéter, ce qui est cohérent avec les résultats observés sur les colorations Hématoxyline et Eosine réalisées précédemment (**Paragraphe 2.2.1**).

Une quantification du pourcentage d'aire de l'épiderme positive à la Caspase-3 active a été réalisée (**Figure 67.B**). La quantification révèle un taux d'apoptose dans l'épiderme variant d'environ 0 à 8 % selon les donneurs au bout de 10 jours de culture. Le pourcentage de mort cellulaire est statistiquement plus élevé pour les modèles perfusés que pour les modèles contrôles pour deux donneurs sur les sept étudiés (Donneurs 5 et 8). L'inverse est observé pour un donneur (Donneur 3). Aucune différence statistiquement significative n'est visible entre les deux conditions pour les trois autres donneurs.

Les résultats obtenus démontrent que la perfusion pendant 10 jours ne semble pas induire de mort cellulaire dans les modèles de peau, en comparaison avec les modèles NativeSkin® contrôles. Un taux plus important d'apoptose est visible pour les modèles FlowSkin pour les donneurs 5 et 8, mais le pourcentage de mort cellulaire reste très faible, et celle-ci est principalement présente au niveau de la zone d'implantation du cathéter, comme observé pour les colorations Hématoxyline et Eosine. D'importantes variabilités inter et intra donneurs sont notables.

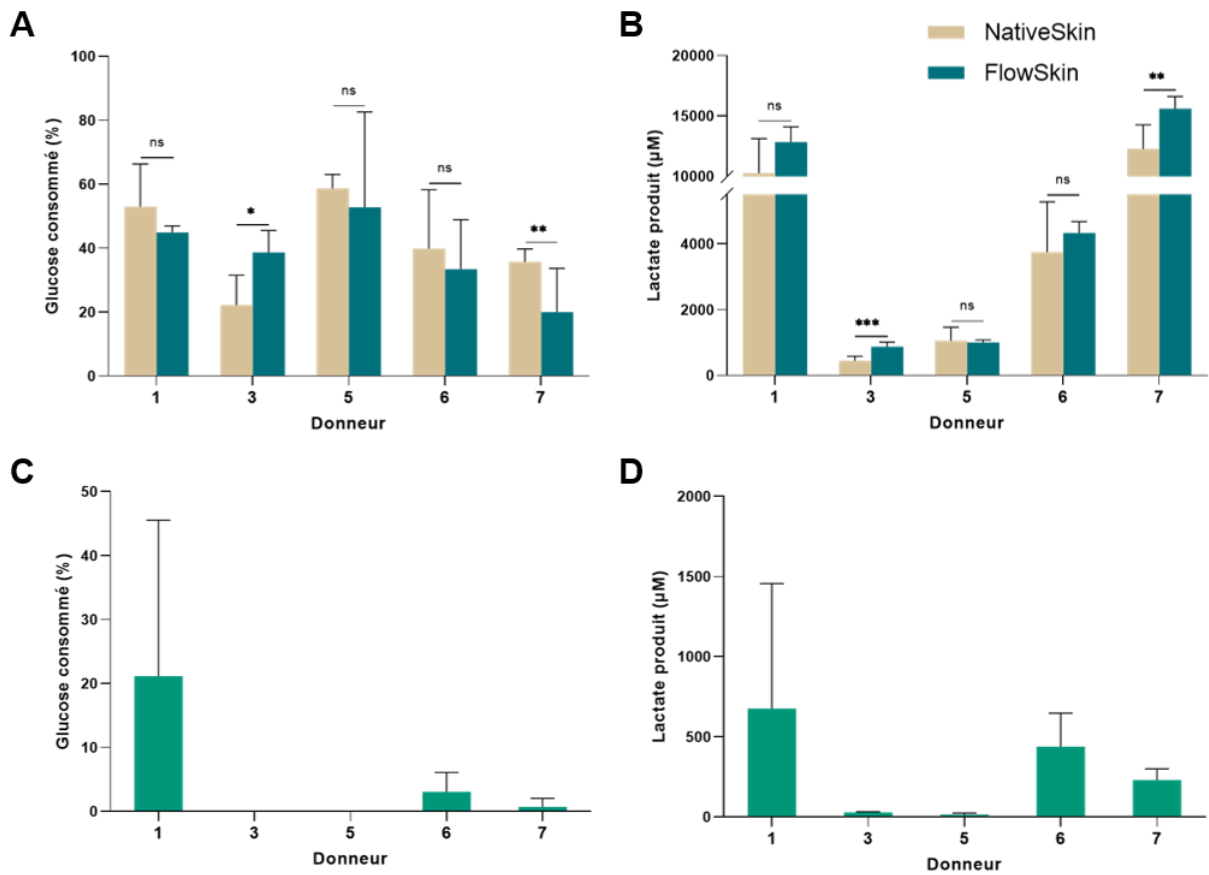


Figure 68. Evaluation de l'impact de la perfusion sur le métabolisme cellulaire des modèles de peau. Des modèles FlowSkin ont été perfusés pendant 10 jours, à un débit moyen de 2,5 µL/min (5 µL/min pendant 30 secondes puis arrêt de la perfusion pendant 30 secondes). L'expérience a été réalisée sur 8 donneurs indépendants, en duplicats (Donneurs 1 à 2 et 6 à 8) ou en quadruplicats (Donneurs 3 à 5). Des modèles NativeSkin® ont également été cultivés pendant 10 jours, et ont servi de condition contrôle. Les milieux de culture ont été renouvelés tous les jours. Les milieux de culture collectés à 10 jours de culture ont été congelés à -80°C. Un dosage de la concentration en lactate et en glucose dans les milieux de culture (**A et B**) des modèles de peau, et dans le flux sortant (**C et D**) des modèles FlowSkin a été réalisé, pour 5 donneurs. Les graphes présentent le pourcentage de glucose consommé (**A et C**) et la concentration en lactate produite (µM) (**B et D**), pour chaque condition et pour chaque donneur (moyenne et écart-type des valeurs obtenus pour chaque réplicat d'une même condition). Un test statistique de Mann-Whitney a été réalisé. ns : $p > 0,05$; * : $p \leq 0,05$; ** : $p \leq 0,01$; *** : $p \leq 0,001$.

2.2.4. Impact de la perfusion sur le métabolisme cellulaire

Afin d'étudier l'impact de la perfusion sur le métabolisme cellulaire des modèles de peau, deux analyses ont été effectuées :

- L'évaluation de la consommation de glucose,
- L'évaluation de la production de lactate.

Ces analyses ont été réalisées sur cinq donneurs, dans le milieu de culture des modèles de peau (**Figure 68.A et 68.B**), mais également dans le flux sortant des modèles FlowSkin (**Figure 68.C et 68.D**).

Le dosage du glucose dans le milieu de culture des modèles NativeSkin® et FlowSkin cultivés 10 jours révèle une consommation de glucose présent dans le milieu par les cellules, variant d'environ 20 à 60 % selon les donneurs (**Figure 68.A**). La différence de consommation de glucose entre les modèles NativeSkin® et les modèles FlowSkin n'est pas statistiquement significative pour trois donneurs sur les cinq étudiés. Cependant, on observe un pourcentage de consommation statistiquement plus élevé pour les modèles perfusés que pour les modèles contrôles pour le Donneur 3, tandis que le phénomène inverse est observé pour le Donneur 7.

Une production de lactate par les cellules est mesurée pour l'ensemble des donneurs, aussi bien pour les modèles NativeSkin® que pour les modèles FlowSkin (**Figure 68.B**). La concentration en lactate produit est très différente d'un donneur à l'autre. Ce type de variabilité est décrit dans la littérature (Ronquist et al., 2003). Aucune différence significative n'est observable en termes de production de lactate entre les modèles perfusés et les modèles contrôles pour trois donneurs sur les cinq étudiés. En revanche, on observe une production statistiquement supérieure par les modèles perfusés pour les donneurs 3 et 7.

Le dosage du glucose dans le flux sortant des modèles FlowSkin (**Figure 68.C**) démontre une consommation du glucose présent dans le milieu de culture perfusé pour trois donneurs sur les cinq étudiés (Donneurs 1, 6 et 7). Cette consommation varie d'environ 1 à 20 % selon les donneurs. De même, du lactate produit par les cellules est collecté dans le flux pour l'ensemble des donneurs étudiés, à des concentrations pouvant aller de quelques micromoles par litres à plus de 500 $\mu\text{mol/L}$ (**Figure 68.D**).

Le métabolisme des cellules de l'épiderme humain est majoritairement anaérobique (Ronquist et al., 2003). De ce fait, la consommation de glucose et la production de lactate sont la preuve d'un métabolisme cellulaire actif, et donc de la viabilité cellulaire (Riviere et al. 1986 ; Wester et al. 1998). Les résultats des dosages de ces deux métabolites dans le milieu de culture des modèles NativeSkin® et FlowSkin démontrent un métabolisme actif de leurs cellules même après 10 jours de culture. De plus, les résultats des dosages de ces métabolites dans le flux sortant des modèles FlowSkin sont la preuve qu'il y a bien des échanges entre le flux et le tissu même après 10 jours de culture.

Les effets de la perfusion sur la physiologie des modèles de peau ont été évalués après 10 jours de culture. L'ensemble des analyses effectuées semble montrer qu'il est possible de perfuser des modèles de peau *ex vivo* pendant 10 jours :

- **En conservant une viabilité cellulaire importante,**
- **En préservant l'intégrité du tissu en périphérie du cathéter,**
- **Sans altérer la prolifération cellulaire,**
- **Sans entraîner de mort cellulaire importante,**
- **En conservant un métabolisme cellulaire actif,**
- **En conservant des échanges entre le fluide perfusé et le tissu.**

Toutefois, une apoptose des cellules de l'épiderme est visible au centre des modèles perfusés, au niveau de la zone d'implantation du cathéter. En vue d'une potentielle utilisation du modèle pour des tests d'efficacité ou d'innocuité de médicaments, cette zone ne doit donc pas être prise en compte dans les analyses. En revanche, les résultats ont montré d'importantes variabilités inter et intra donneurs.

3. Evaluation de l'impact de la modulation de la pression à l'intérieur du cathéter sur l'efficacité des échanges entre le perfusé et la peau

La caractérisation de la diffusion dans le modèle perfusé et l'évaluation de l'impact de la perfusion sur la physiologie de la peau ont clairement mis en évidence des problèmes de variabilités *inter* et *intra*-donneurs. De plus, nous avons observé que la diffusion des espèces depuis le cathéter était inhomogène et que les échanges ne s'établissaient pas avec la même efficacité par tous les pores du cathéter (**Figure 57**). Par ailleurs, un problème de diffusion des composés de hauts poids moléculaires à travers les pores du cathéter a été découvert (**Figure 60**). Enfin, nous nous sommes également rendu compte que les échanges entre le flux et le tissu semblaient diminuer au cours de la culture (**Figure 56**).

Il est intéressant d'analyser le mécanisme permettant l'échange et la diffusion des espèces depuis le cathéter : une première hypothèse consiste à considérer un contact homogène entre le tissu et la surface du cathéter. Dans cette situation les seuls échanges possibles ont lieu au niveau des pores, où le tissu est en contact avec le perfusé. La diffusion des espèces a lieu sur une surface équivalente à celle du pore. Une deuxième hypothèse consiste à considérer qu'un flux convectif est possible au travers des pores et que des microréservoirs de perfusé de faibles volumes sont créés entre le cathéter et le tissu. Les espèces présentes dans le perfusé peuvent ensuite migrer par diffusion depuis ces régions.

Sur la base de ces deux scénarios, différentes hypothèses pourraient expliquer les phénomènes de variabilités décrits précédemment :

- La peau est variable d'un donneur à l'autre, en termes d'épaisseur et de tonicité notamment,
- Le cathéter n'est pas systématiquement implanté à la même profondeur dans la biopsie,

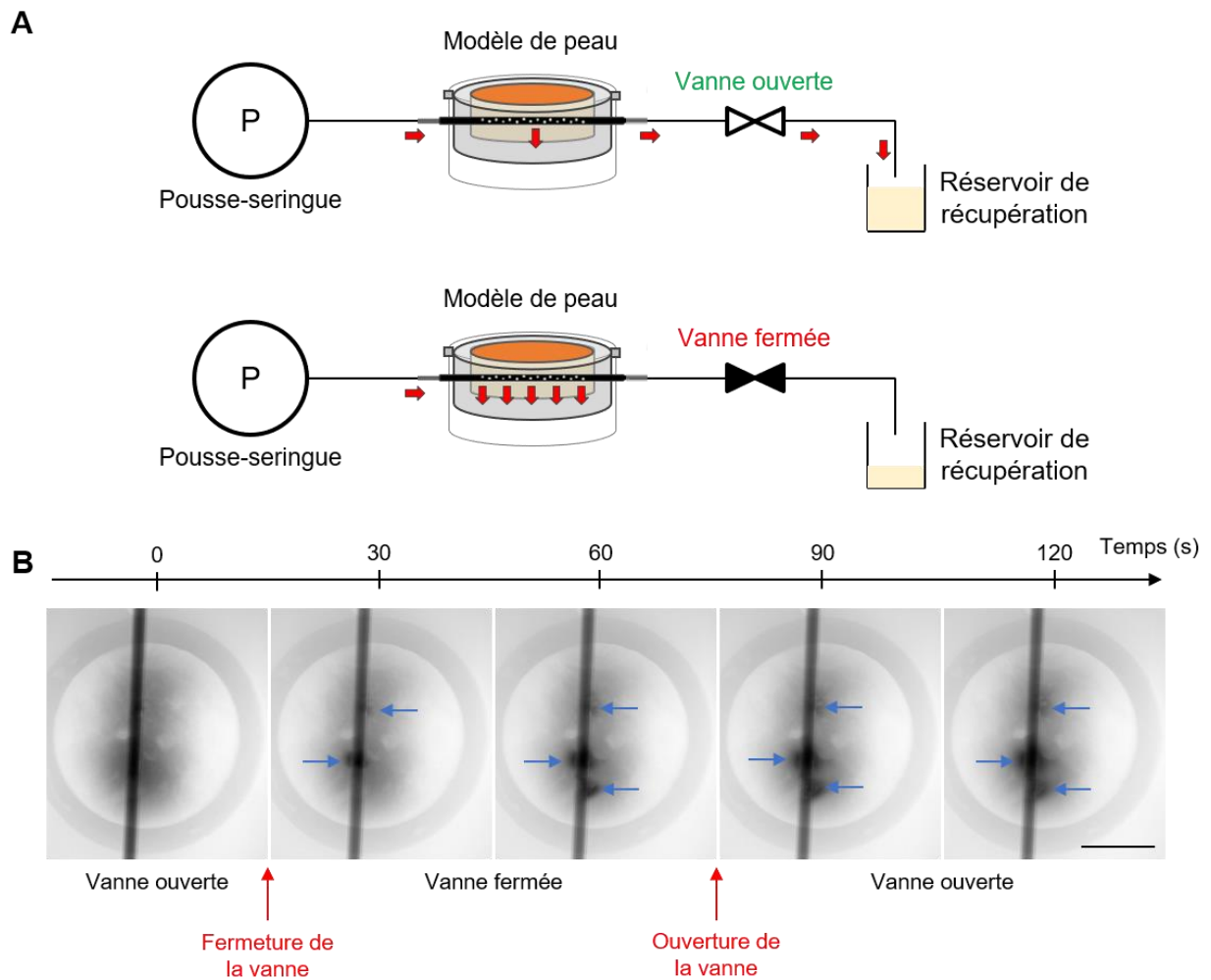


Figure 69. Induction d'une surpression dans le dispositif microporeux. (A) Représentation schématique de la méthode utilisée pour moduler la pression au sein du dispositif microporeux. Une vanne est placée en sortie du cathéter. Lorsqu'elle est ouverte, le fluide perfusé s'écoule de façon traversante et est récupéré en sortie dans un réservoir de récupération. Lorsque la vanne est fermée, le fluide ne peut plus s'écouler dans le réservoir de récupération. L'extrémité du cathéter étant fermée, une surpression est induite dans le dispositif micro, forçant le fluide à sortir par les pores. **(B)** Radiographie aux rayons X d'un modèle FlowSkin, vue de dessus. Une image a été prise toutes les trente secondes. Le modèle a été perfusé suivant un cycle de 4 minutes de perfusion avec la vanne ouverte à 2,5 $\mu\text{L}/\text{min}$, suivies d'une minute de perfusion avec la vanne fermée à 10 $\mu\text{L}/\text{min}$. Les flèches bleues pointent des pores du cathéter. Barre d'échelle : 5 mm.

- Des bulles d'air sont présentes dans les pores du cathéter, empêchant un contact direct entre le perfusé et le tissu
- Le tissu se modifie au cours du temps, ce qui engendre le colmatage des pores du cathéter réduisant ainsi la surface d'échange entre le liquide et le tissu ou limitant le flux de liquide au travers des pores.

Dans le cas des deux derniers scénarios, une solution envisagée est d'induire une légère surpression dans le dispositif microporeux afin de favoriser le passage du fluide par les pores du cathéter pour atteindre le tissu.

3.1 Induction d'une surpression dans le dispositif microporeux

Afin de moduler la pression au sein du dispositif microporeux, une vanne est ajoutée en aval du cathéter (**Figure 69.A**). Lorsque cette vanne est ouverte, le fluide s'écoule normalement dans le système microfluidique et est collecté en sortie. Lorsque cette vanne est fermée, le fluide ne peut plus s'écouler en sortie du système microfluidique. La pression dans le système augmente alors, forçant le liquide à s'écouler vers les zones de plus faible pression localisées dans le tissu et donc au travers des pores du cathéter.

Un modèle FlowSkin a été imagé en radiographie à rayons X. Un agent de contraste a été perfusé dans l'explant de peau (**Figure 69.B**) suivant un cycle de perfusion alternant des phases avec la vanne ouverte, et des phases avec la vanne fermée.

Les résultats obtenus montrent qu'après la première fermeture de la vanne, l'agent de contraste semble diffuser à partir de certains pores du cathéter par lesquels il ne diffusait pas lorsque celle-ci était ouverte. Cette observation suggère que les échanges au niveau de ces pores sont favorisés par l'induction d'une surpression. Une hypothèse légitime serait de considérer qu'un flux de molécules est induit par convection au niveau des pores jusqu'à la surface externe du cathéter, au contact du tissu. C'est à partir de cette région que la diffusion des espèces peut avoir lieu.

3.2 Evaluation de l'impact de l'induction d'une surpression dans le cathéter sur les échanges entre le perfusé et le tissu

Un premier test a été réalisé en perfusant des modèles de peau pendant 24 heures, à un débit de 2,5 $\mu\text{L}/\text{min}$, avec du colorant alimentaire bleu à 0,5 % (poids/volume) dans du PBS. Le cycle suivant a été appliqué : la vanne a été fermée pendant 4 minutes, puis ouverte pendant 1 minute et ainsi de suite. La diffusion du colorant à la surface des modèles a été évaluée macroscopiquement, et comparée avec la diffusion à la surface de modèles perfusés avec les mêmes conditions que dans les expériences précédentes, à savoir un débit moyen de 2,5 $\mu\text{L}/\text{min}$ avec une perfusion à 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ pendant 30 secondes suivie d'un arrêt de la perfusion pendant 30 secondes. L'expérience a été réalisée sur deux donneurs indépendants, avec 6 réplicats pour le premier donneur et 3 réplicats pour le deuxième donneur (**Figure 70**).

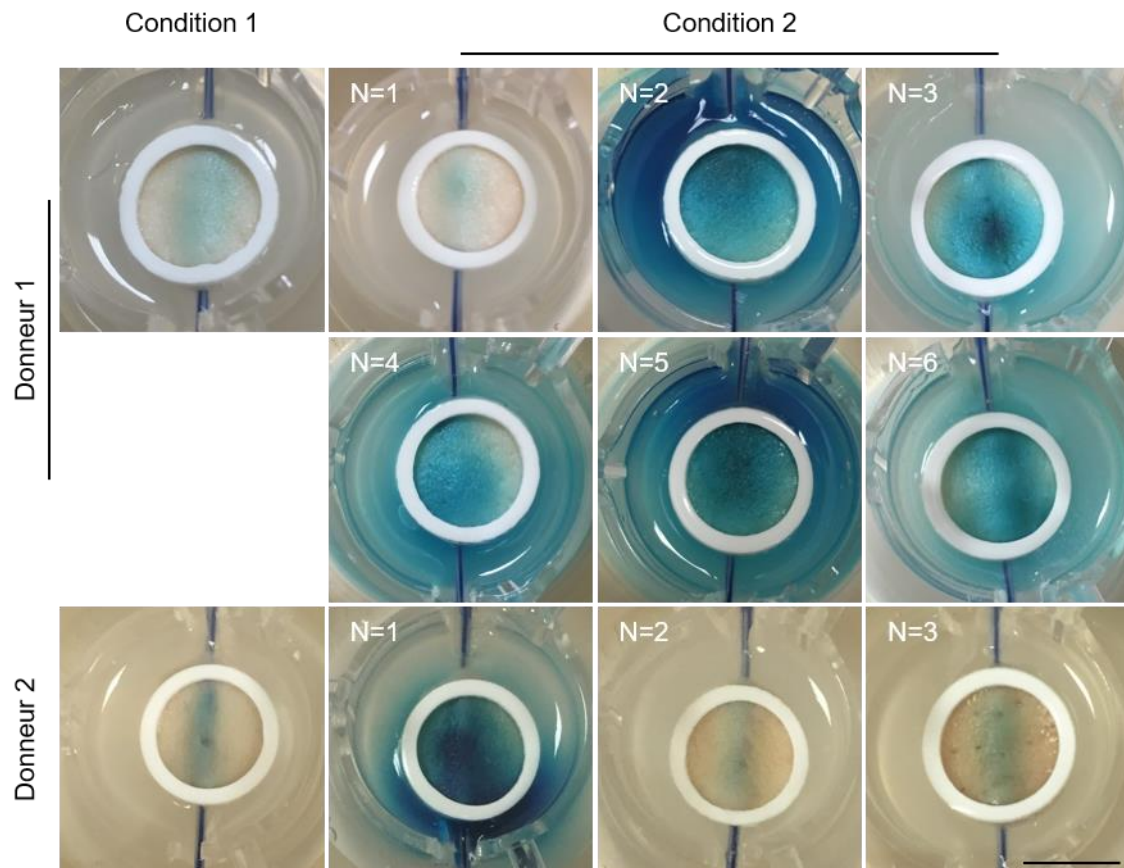


Figure 70. Evaluation de l'impact de l'induction d'une surpression dans le cathéter sur les échanges entre le perfusé et le tissu. Des modèles FlowSkin ont été perfusés pendant 24 heures avec du colorant alimentaire bleu à 0,5 % (poids/volume) dans du PBS. L'expérience a été réalisée sur deux donneurs indépendants, avec 6 répliqués pour le premier donneur et 3 répliqués pour le deuxième donneur. Condition 1 : perfusion à un débit moyen de 2,5 μ L/min (5 μ L/min pendant 30 secondes puis arrêt de la perfusion pendant 30 secondes). Condition 2 : perfusion à un débit constant de 2,5 μ L/min, vanne fermée pendant 4 minutes, puis ouverte pendant 1 minute. Barre d'échelle : 1 cm.

Les résultats obtenus pour les modèles perfusés montrent des profils d'intensité de coloration différents selon les répliquats (**Figure 70**).

En ce qui concerne le Donneur 1, trois scénarios différents sont observables :

- Une légère coloration de la surface de la peau, au centre de la biopsie, au niveau du cathéter (Répliquat 1), similaire à celle observée pour les modèles contrôles (Condition 1).
- Une coloration très intense, relativement homogène sur toute la surface de la biopsie, accompagnée d'une forte coloration de la matrice, localisée au niveau de la zone d'insertion du cathéter (Répliquats 2 et 5),
- Une coloration relativement homogène sur l'ensemble de la surface de la biopsie, accompagnée d'une légère coloration de la matrice (Répliquats 3, 4 et 6).

En ce qui concerne le Donneur 2, deux de ces scénarios sont observables pour les modèles perfusés : les répliquats 2 et 3 ont des profils d'intensité de coloration qui semblent similaires à celui du modèle contrôle (Condition 1), tandis que le premier répliquat présente une coloration très intense à la fois de la surface de la peau et de la matrice.

Ces résultats mettent en évidence plusieurs points. Tout d'abord, ils permettent de démontrer que l'induction d'une surpression à l'intérieur de cathéter microporeux pourrait permettre d'améliorer les échanges entre le perfusé et le tissu, mais pas de manière reproductible. De plus, dans le cas où les échanges entre le flux et le tissu semblent améliorés, des fuites du perfusé dans la matrice peuvent être visibles, et semblent localisées au niveau de la zone d'insertion du cathéter dans la peau.

Ce problème de reproductibilité pourrait être attribué à une altération de la structure de certaines biopsies, potentiellement due à l'insertion du cathéter dans la peau. Les paramètres de perfusion pourraient également être remis en question, et des tests devraient être réalisés afin de déterminer la durée de fermeture de la vanne la plus appropriée pour gagner en reproductibilité. Enfin, dans les cas où la surpression ne semble pas avoir d'effet sur les échanges entre le perfusé et le tissu, il serait intéressant de poursuivre la culture afin d'évaluer si cette perfusion permet de maintenir des échanges constants au cours du temps.

L'ensemble de ces résultats démontre que l'induction d'une légère surpression dans le dispositif microporeux pourrait permettre d'améliorer les échanges entre le perfusé et le tissu. Cependant, un manque de reproductibilité dans les expériences a encore une fois été mis en évidence. Les différentes hypothèses pouvant expliquer ces problèmes ainsi que des propositions d'amélioration du système seront détaillées dans la partie Discussion de ce manuscrit.

DISCUSSION

Cette discussion sera articulée autour de trois parties.

Dans un premier temps, les différentes étapes de développement ayant conduit à la production du modèle *ex vivo* de peau humaine perfusé seront discutées, et des pistes d'améliorations seront proposées.

La deuxième partie portera sur la discussion de l'amélioration des échanges avec le tissu induite par la perfusion.

Enfin, dans une troisième et dernière partie, les perspectives d'applications du modèle FlowSkin seront présentées.

Partie 1. Développement d'un modèle *ex vivo* de peau humaine perfusé

L'objectif de ce projet de recherche est le développement, la validation et la caractérisation d'un modèle *ex vivo* de peau humaine perfusé. La stratégie sélectionnée repose sur l'implantation d'un dispositif poreux dans le derme du modèle de peau humaine *ex vivo* Nativeskin®, développé par la société Genoskin (**Figure 27**).

Afin de parvenir au développement de ce modèle, différentes étapes ont été nécessaires : le développement et le choix d'un dispositif implantable adapté, le développement d'une procédure d'implantation du dispositif dans les modèles de peau, ainsi que l'adaptation du protocole de production du modèle de peau NativeSkin® classique pour la production du modèle perfusé.

Ces différentes étapes seront discutées au cours de cette première partie, et des améliorations seront proposées.

1. Développement et choix du dispositif implantable

Afin de permettre l'administration et la collecte de composés au sein du tissu, nous avons choisi d'implanter un dispositif poreux dans le derme d'un explant de peau.

Le cahier des charges pour le développement et le choix du dispositif était le suivant :

- Le matériau utilisé pour la fabrication du dispositif doit être biocompatible,
- Le dispositif doit pouvoir être implanté facilement dans le derme d'une biopsie de peau, il doit résister à la force exercée par le derme lorsqu'on souhaite y insérer l'aiguille, ce dernier pouvant être très dense et résistant,
- Le dispositif doit pouvoir être relié facilement à des connecteurs et à des tubes microfluidiques,
- Le dispositif doit avoir une longueur suffisante pour pouvoir être implanté de façon traversante dans une biopsie de 15 mm de diamètre, et doit dépasser suffisamment de part et d'autre de la peau pour pouvoir être relié à des connecteurs ou à des tubes microfluidiques, en tenant compte du diamètre de l'insert dans lequel la biopsie est cultivée,
- Le dispositif doit pouvoir permettre l'administration et la collecte de composés de différents poids moléculaires, que ce soit de petites molécules telles que des nutriments présents dans le milieu de culture, des cytokines ou bien des anticorps monoclonaux, voire des cellules,
- L'implantation prolongée du dispositif ne doit pas entraîner d'altérations significatives et problématiques de la structure et de l'intégrité de l'explant de peau,
- Le dispositif doit permettre la perfusion du modèle pendant au moins sept jours, tout en conservant ses caractéristiques initiales en termes de porosité,
- Le dispositif doit pouvoir être produit facilement en série, en grandes quantités,
- Le coût de revient du dispositif ne doit pas être supérieur à 50 euros, car le développement, la validation et la caractérisation du modèle nécessite un nombre important d'expériences avant de pouvoir envisager sa commercialisation.

Deux options se sont présentées. La première consiste à utiliser des dispositifs poreux commerciaux, déjà validés pour des applications relativement similaires, à savoir des

sondes de microdialyse linéaires. La seconde option consiste à fabriquer nos propres dispositifs, en réalisant des pores dans des tubes.

Les sondes de microdialyse commerciales répondent à un grand nombre de critères du cahier des charges.

Ces sondes étant utilisées en routine pour de la microdialyse cutanée (Hersini et al. 2014 ; Rea and Kirby 2019), elles sont validées cliniquement pour une implantation dans le derme et considérées comme biocompatibles. Leur implantation dans la peau est facilement réalisable, grâce aux aiguilles-guides fournies. Les sondes sont constituées d'une membrane poreuse de 10 mm de longueur, reliée en entrée à un tube de 10 cm et à un connecteur de type femelle luer-lock, et reliée en sortie à un tube de 35 cm (**Figure 28**). Elles peuvent donc être facilement connectées à un système microfluidique. Une large gamme de porosité est proposée, de 6 à 3000 kDa, permettant l'échantillonnage de molécules de différents poids moléculaires (Jadhav et al. 2016). Du fait du faible diamètre externe de la sonde (300 μm), et de son aiguille (600 μm), l'implantation n'entraîne pas de déformation apparente du tissu. Enfin, ces sondes étant des dispositifs commerciaux, il est facile de se les procurer en grande quantité.

En revanche, l'utilisation des sondes de microdialyse linéaires présente certaines limites. Nos résultats montrent qu'après environ 48 heures de culture, les sondes comportant une membrane poreuse avec une limite de porosité de 50 kDa se colmatent et ne permettent pas d'assurer des échanges efficaces et reproductibles avec le tissu. Leur utilisation ne semble donc pas indiquée pour les temps de culture que nous visons. Ce problème de colmatage et de diminution de la performance au cours de la culture a déjà été décrit dans la littérature (Stenken et al. 2010 ; Sides and Stenken 2014 ; Ramirez Molina et al. 2019), principalement en raison de l'adsorption de protéines sur la membrane, et de la structure microporeuse des parois qui la constituent. De plus, le coût de ces sondes est relativement élevé : il est d'environ 75 euros l'unité. La fabrication de nos propres sondes de microdialyse serait une option envisageable afin de réduire le coût. Différentes équipes de recherche ont exploré cette possibilité (Stagni et al. 2000 ; Bettahalli et al. 2011 ; Chuang et al. 2014).

La seconde option consiste à fabriquer nos propres dispositifs en intégrant des pores par microfabrication dans un tube d'un matériau biocompatible.

Nous avons choisi d'utiliser un cathéter veineux périphérique commercial, utilisé traditionnellement en clinique pour l'administration de composés par voie intraveineuse. L'intérêt d'utiliser ce type de cathéter est qu'il est validé pour une implantation dans le corps humain à long terme, facilement connectable à un système microfluidique grâce à son connecteur de type femelle luer-lock, et implantable grâce à l'aiguille dont il est constitué. L'utilisation d'un tube poreux aurait nécessité un important travail de mise au point pour l'adapter à l'ensemble de nos critères et contraintes. Le cathéter que nous avons sélectionné possède un diamètre externe de 1,1 mm et une longueur de 32 mm. C'est le plus petit diamètre proposé sur le marché qui possède une longueur suffisante pour être implanté dans une biopsie de 15 mm de diamètre tout en conservant suffisamment de matière de part et d'autre de la biopsie pour être connecté avec un système microfluidique. Il a un diamètre suffisant pour créer des pores d'au moins 50 μm de diamètre, tout en conservant une bonne tenue mécanique. En effet, nous souhaitons pouvoir réaliser des pores avec un diamètre suffisamment élevé pour ne pas induire de

problème de colmatage, mais suffisamment petit pour maintenir la structure de la peau et éviter une infiltration du tissu dans le cathéter.

Cette stratégie permet également de choisir le diamètre des pores, de moduler leur disposition pour orienter le flux au niveau spatial, et de choisir la longueur de la zone poreuse afin de s'adapter à tous les diamètres de biopsies.

La réalisation des cathéters est une étape complexe, de par la géométrie cylindrique du cathéter, de la faible épaisseur de sa paroi et de sa fragilité mécanique. Dans cet objectif, nous avons choisi de réaliser des pores en spirale, afin de conserver une bonne tenue du cathéter. En effet, des tests ont été réalisés précédemment avec des pores distribués de façon longitudinale, mais le cathéter se repliait sur lui-même au moment de l'implantation dans la peau.

Au-delà de la stabilité mécanique, le perçage doit être précis, offrir une bonne reproductibilité sur la taille des pores et un contrôle précis de leur distribution sur le cathéter. Enfin, le protocole de fabrication doit être compatible avec la géométrie cylindrique des cathéters, c'est à dire permettre la réalisation des pores sur une paroi sans affecter la paroi opposée.

Nous avons choisi d'utiliser la technique de l'ablation laser pour réaliser les pores du cathéter : cette technique permet d'obtenir des perçages avec des bords verticaux, sans fonte du matériau due à la chaleur (Tiaw et al. 2008). D'autres techniques auraient pu être envisagées, telles que la gravure (Weston et al. 2001), la découpe au jet d'eau (Birtu and Avramescu 2012) ou le perçage mécanique (Boswell et al. 2018) mais elles ne permettent pas d'obtenir une résolution suffisante pour atteindre des pores 50 μm de diamètre, ou un coût de fabrication inférieur à 50 euros par cathéter, limite que nous avons fixé en début de projet.

Un premier essai de perçage a été réalisé, à l'aide d'un laser à CO_2 disponible au LAAS-CNRS (**Matériel & Méthodes, Paragraphe 1.2.2.d**). Avec ce type de laser, nous sommes parvenus à obtenir des pores de 300 à 400 μm de diamètre environ (**Figure 29**). L'utilisation de ce type d'équipement ne laisse pas l'opportunité de réduire ce diamètre. Par ailleurs, nous avons observé que la fabrication de ces pores n'était pas reproductible : leur forme était ovoïde, des débris étaient présents conduisant parfois à des pores encore bouchés, et leur diamètre était variable pour des mêmes conditions d'énergie et de vitesse d'usinage. Outre la reproductibilité de l'équipement, le positionnement et l'alignement de chaque cathéter se faisaient manuellement et de façon séquentielle dans la machine induisant des variations sur la position des pores et conduisant à un processus de fabrication très lent. Cette solution n'apparaissait donc pas comme compatible avec une production à grande échelle.

Nous avons donc fait appel à une entreprise spécialisée dans les lasers, ALPhANOV, afin de développer un protocole de perçage automatisé permettant d'obtenir des pores de façon reproductible et contrôlée (**Figure 30**). L'utilisation d'un laser pulsé et d'un système de positionnement mécanique asservi a permis d'atteindre des tailles de pore de l'ordre de 50 μm de diamètre. La diminution du diamètre des pores a permis la modification du design du perçage : les pores ont été rapprochés, afin d'obtenir une grande surface d'échange entre le perfusé et le tissu tout en conservant la même longueur de zone poreuse. De ce fait, nous avons pu nous procurer de grands volumes de pièces rapidement, à un coût unitaire d'environ 35 euros, soit environ la moitié du prix d'une sonde de microdialyse. Une amélioration pourrait tout de même être apportée aux cathéters, concernant la longueur de la zone poreuse. En effet, des pores ont été réalisés sur une longueur de 10 mm, centrée sur le cathéter. Après implantation dans une biopsie de 15

mm, les premiers pores se retrouvent très proches de la zone d'implantation, ce qui pourrait en partie expliquer les fuites observées à ce niveau-là. Des essais seront réalisés en réduisant la longueur de la zone poreuse. A titre d'exemple, les sondes de microperfusion ont une zone poreuse de 15 mm de longueur, et sont implantées dans la peau sur une distance de 30 mm (Bodenlenz et al. 2013).

L'inconvénient majeur du cathéter microporeux, en comparaison avec la sonde de microdialyse, est la déformation de l'explant qu'il engendre suite à son implantation (**Figure 37**). Comme expliqué précédemment, les cathéters possédant un diamètre inférieur disponible commercialement ne sont pas compatibles avec notre application, car ils ont une longueur insuffisante. Le développement de dispositifs spécifiques est envisageable, mais requiert de nombreux développements technologiques, ce que nous n'avons pas été en capacité de réaliser durant ce projet, tant au niveau du temps que du coût.

Les sondes utilisées dans le cadre de la microperfusion en libre circulation (**Figure 18, Introduction Partie 1, paragraphe 1.2.2**), développées par l'institut de recherche Joanneum Research Health (Autriche), pourraient être une bonne alternative (Bodenlenz et al. 2013). En effet, ces sondes ne comportent pas de membrane, ce qui élimine les problèmes rencontrés avec la microdialyse, et n'implique pas de phénomène de filtration du perfusé ou du fluide interstitiel. Ces sondes ont un diamètre de 500 μm , légèrement supérieur à celui des sondes de microdialyse mais bien inférieur à celui des cathéters microporeux. Les parois de la sonde tubulaire développée sont constituées d'un enchevêtrement de filaments en acier inoxydable, entrelacés les uns avec les autres en se chevauchant en diagonale pour former un maillage (Bodenlenz et al. 2015, 2017). Cette technique brevetée permet d'obtenir un matériau mécaniquement stable et de porosité contrôlée. Ces sondes sont disponibles commercialement pour un coût de 60 euros l'unité environ. Elles seront prochainement testées afin de les comparer aux cathéters microporeux.

2. Implantation du dispositif microporeux dans la peau

2.1 Procédure d'implantation du dispositif

Les cathéters veineux périphériques, comme les sondes de microdialyse ou les sondes de microperfusion à libre circulation, sont habituellement utilisés en clinique chez l'Homme. *In vivo*, la peau a des propriétés de résistance et de déformation liées à sa continuité à la surface du corps, et à la présence de l'hypoderme et du muscle. Les biopsies de peau *ex vivo* ne possèdent plus cette tenue mécanique, ce qui complique l'implantation d'un dispositif dans le derme. En effet, celui-ci doit être implanté parallèlement à l'épiderme, le plus proche possible de celui-ci sans toutefois le transpercer.

Deux méthodes d'implantation ont été développées : la première est manuelle, et la seconde nécessite l'utilisation d'un outil de guidage imprimé en 3D.

La première méthode d'implantation développée se fait manuellement, à l'aide d'une pince courbe. Elle consiste à placer la biopsie face épiderme vers le bas sur un support, et à la maintenir fermement au niveau de la zone d'implantation avec la pince. Le cathéter est inséré dans le derme entre les deux doigts de la pince, et enfoncé dans la biopsie jusqu'à ressortir à l'extrémité opposée (**Figure 31**).

Cette technique d'implantation manuelle possède plusieurs limites. La profondeur d'implantation et le centrage dans la biopsie sont peu contrôlés donc peu reproductibles. Le risque de transpercer l'épiderme lors de l'implantation est élevé. Cela nécessite de prévoir des biopsies supplémentaires en cas de mauvaise implantation, et donc une grande surface de peau initiale. Une autre limite de cette méthode d'implantation réside dans l'endommagement potentiel de l'épiderme dans les zones périphériques de la biopsie dû au maintien ferme de la biopsie avec la pince. La zone de la biopsie maintenue par la pince est toutefois placée sous l'anneau en silicone collé à la surface de l'explant lors de la production du modèle. Cette zone n'est donc pas prise en compte lors des analyses histologiques ou biochimiques.

La seconde méthode d'implantation utilise un outil spécialement développé et imprimé en 3D. Il s'agit d'un gabarit qui permet de maintenir la biopsie de peau lors de l'implantation, grâce à deux pièces aimantées, ainsi qu'une couronne et des ergots (**Figure 32**). Les deux pièces qui composent l'outil possèdent chacune une fente, permettant de guider le cathéter lors de son implantation une fois les deux pièces aimantées. Ainsi, celui-ci est bien centré dans la biopsie, et implanté à la même profondeur par rapport à l'épiderme pour tous les explants. Bien qu'il permette de standardiser l'étape d'implantation, cet outil a été développé pour une biopsie d'une épaisseur moyenne de 3 mm. Or, l'épaisseur des biopsies varie selon les donneurs ou selon la zone anatomique ou la peau a été prélevée, entre le dos ou le ventre par exemple. Ainsi, si la biopsie a une épaisseur inférieure à 3 mm, elle risque de ne pas être suffisamment maintenue par l'outil, et l'implantation du cathéter ne sera pas possible. De même, si la biopsie est plus épaisse, la couronne et les ergots risquent d'altérer sa structure et son intégrité. De plus, l'utilisation de cet outil n'est pas compatible avec des injections intradermiques réalisées en amont de l'implantation du cathéter, car les ergots risqueraient d'entraîner la fuite du composé administré. Il serait souhaitable d'améliorer la conception de cet outil en concentrant les ergots à la périphérie de la biopsie pour laisser les deux pièces creuses dans les zones de contact avec la biopsie. Ainsi, le système serait compatible avec différentes épaisseurs.

2.2 Impact de l'implantation du dispositif sur la physiologie de la peau

Le manque de reproductibilité des échanges entre le perfusé et le tissu, et les fuites de liquide qui peuvent être observées au niveau de la zone d'insertion du cathéter dans la biopsie, pourraient être associées aux dommages engendrés au tissu par l'implantation du cathéter.

L'implantation du cathéter dans la biopsie de peau est une étape traumatisante pour le tissu. En effet, la procédure d'implantation nécessite d'une part le maintien ferme de la biopsie à l'aide des deux doigts d'une pince, et d'autre part engendre une lésion lors de l'insertion du cathéter. Cette lésion et la perte de cohésion du tissu engendrée localement pourraient être à l'origine de la formation de chemins de fuite le long du cathéter permettant

le passage du fluide. De plus, une fois implanté, le cathéter entraîne une déformation de la biopsie et une mise en tension localisée du tissu. L'amélioration de la technique d'implantation et la diminution du diamètre du dispositif poreux seraient donc des éléments clés qui pourraient améliorer la viabilité du modèle de peau perfusé et la reproductibilité des résultats de perfusion.

L'impact de l'implantation prolongée du dispositif sur la physiologie de la peau a été analysé en histologie. Les résultats ont montré que l'implantation du cathéter pendant sept jours n'avait qu'un impact modéré sur la viabilité du modèle, avec un maintien de la structure et de l'intégrité du tissu (**Figures 33 et 37**), l'absence de cellules apoptotiques (**Figure 36**), et seulement une légère diminution de la prolifération cellulaire au niveau de la zone d'implantation du cathéter (**Figure 34**). Cette étude a été réalisée en comparaison avec des modèles NativeSkin® contrôlés.

Cependant, des études réalisées *in vivo* afin d'évaluer l'impact de l'implantation d'une sonde de microdialyse sur l'intégrité de la peau ont montré que la désorganisation de l'environnement direct de la sonde pouvait être à l'origine de réactions tissulaires diverses, notamment de réactions inflammatoires, même en l'absence de perturbations tissulaires ou d'œdèmes (Ault et al. 1994 ; Davies and Lunte 1995). Ces réactions inflammatoires sont dénommées « réactions inflammatoires à un corps étranger » (pour *Foreign Body Reactions* en anglais) et ont été caractérisées suite à l'implantation de dispositifs médicaux (Coleman et al. 1974). Durant les réactions inflammatoires à un corps étranger, le système immunitaire va tenter de détruire l'objet indésirable, mais aussi de restaurer la fonction du tissu endommagé en prévenant les infections et en réparant le tissu (Sides and Stenken 2014).

Différentes étapes caractéristiques de la réaction inflammatoire à un corps étranger ont été mises en évidence à proximité de celui-ci, telles que l'adsorption de protéines à la surface du matériau, le recrutement de cellules inflammatoires, notamment des monocytes, la formation de cellules géantes, ainsi que la formation de matrice extracellulaire et la fibrose (Anderson et al. 2008 ; Stenken et al. 2010 ; Sides and Stenken 2014).

Dans les modèles de peau *ex vivo*, certaines étapes de ce processus ne peuvent pas avoir lieu, en raison de l'absence de circulation sanguine, telles que le recrutement de cellules inflammatoires présentes dans le sang par exemple. Cependant, la présence de cellules immunitaires résidentes a été démontrée pour le modèle NativeSkin® (De Wever et al. 2015 ; Jardet et al. 2020). La réaction inflammatoire à un corps étranger pourrait donc tout de même être caractérisée dans nos modèles suite à l'implantation du cathéter, en étudiant la dégranulation des mastocytes présents dans le tissu, ou la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-6, l'IL8 ou l'IL-33 par exemple.

3. Production du modèle perfusé

Afin de pouvoir maintenir le modèle de peau perfusé en culture pendant plusieurs jours, le protocole de production habituellement utilisé pour le modèle NativeSkin® a dû être modifié. Différentes étapes de ce protocole ont été déterminées comme critiques, et pourraient accentuer la fragilisation de la peau due à l'implantation du cathéter, et ainsi

favoriser les fuites du perfusé, et entraîner un manque de reproductibilité dans nos expériences.

Après implantation du cathéter dans la biopsie, l'ensemble doit être manipulé à plusieurs reprises : pour retourner la biopsie afin de vérifier que le cathéter n'a pas transpercé le modèle, pour coller les anneaux en silicone à la surface de la peau, pour connecter les extrémités du cathéter à des tubes et à des connecteurs, ainsi que pour déposer l'ensemble dans l'insert contenant la matrice liquide. Une fois celle-ci solidifiée, le modèle doit encore être manipulé afin de connecter les tubes aux aiguilles insérées dans la paroi des supports de culture en PDMS (**Figure 38.B**). Toutes ces étapes sont susceptibles de faire bouger le cathéter dans la biopsie, et ainsi d'accentuer les dommages liés à son implantation.

Afin d'améliorer la stabilité mécanique du modèle, nous avons choisi de recouvrir la matrice et l'anneau d'une colle en silicone. Nous pourrions également envisager de sceller la zone d'implantation du cathéter dans la biopsie avec une colle de type cyanoacrylate d'octyle, utilisée en clinique pour suturer certaines plaies superficielles (Toriumi et al. 1998 ; Toriumi and Bagal 2002). La colle permettrait de renforcer la solidité du modèle au niveau de la zone d'implantation du cathéter afin d'éviter qu'il ne bouge. Cette colle est d'ailleurs utilisée dans cette optique lors de l'implantation des sondes de microperfusion en libre circulation (Bodenlenz et al. 2013).

Le support de culture contenant le modèle perfusé est ensuite connecté au reste du système microfluidique, à savoir le pousse-seringue en entrée, et une vanne trois voies qui amène au réservoir de récupération en sortie. Cette connexion se fait grâce aux aiguilles insérées dans les parois du support de culture (**Figure 38.B**). Le support est placé dans un incubateur, afin de maintenir le modèle perfusé en culture pendant 7 à 10 jours. Le milieu de culture des modèles de peau est renouvelé tous les jours. Cela implique de déconnecter le support de culture du reste du système microfluidique, afin de pouvoir le déplacer sous un PSM. Cette manipulation, réalisée deux fois par jours pour déconnecter et reconnecter le modèle, peut potentiellement accentuer les dommages causés par le cathéter sur le tissu, en entraînant la torsion du cathéter au moment de la connexion entre les connecteurs luer-lock mâle et femelle. Une solution pourrait être d'effectuer ces connexions et déconnexions à un niveau plus éloigné des supports de culture dans le système microfluidique, grâce à l'ajout de vannes ou de connecteurs de type *tube-to-tube* par exemple.

Une autre piste pour faciliter la production du modèle perfusé et gagner en reproductibilité pourrait être le développement d'un protocole standardisé et automatisé afin de créer des zones d'ancrage micro-usinées dans les inserts de culture pour permettre le maintien des tubes et des cathéters.

Partie 2. Amélioration des échanges avec le tissu grâce au système de perfusion

L'objectif de la perfusion d'un modèle de peau *ex vivo* est d'améliorer le transport de masse au sein du tissu, que ce soit en nutriments, en oxygène ou en médicaments, ainsi que l'élimination des déchets. Afin de caractériser la diffusion des molécules dans la peau et de valider ou non l'efficacité de la perfusion, différentes méthodes d'analyse ont été développées (**Résultats, Partie 2**). Des coefficients de diffusion de différents composés ont été déterminés expérimentalement (**Figures 42, 43 et 47**), afin de permettre le développement d'un modèle numérique de la diffusion dans un explant de peau. Les échanges moléculaires dans le modèle perfusé ont été caractérisés à l'aide de ces différentes méthodes d'analyse (**Résultats, Partie 2, Paragraphe 1**).

Ces différents points seront discutés au cours de cette partie, et des pistes d'amélioration seront proposées, afin de résoudre les problèmes expérimentaux évoqués au cours de ce manuscrit.

1. Détermination des coefficients de diffusion de différents composés dans la peau

La diffusion de différents composés dans les explants de peau humaine a été caractérisée par la détermination de coefficients de diffusion. Pour cela, deux méthodes ont été mises en œuvre : la première basée sur l'utilisation d'un colorant alimentaire bleu, et la seconde basée sur l'utilisation de dextrans couplés à des fluorophores.

Pour chacune de ces deux méthodes, les coefficients de diffusion mesurés ne sont qu'une estimation des coefficients de diffusion réels. En effet, différentes approximations ont dû être faites, afin de faciliter la mise en place expérimentale.

Les méthodes ont consisté à placer une biopsie de peau en flottaison sur un composé, du colorant ou du dextran, pendant quelques heures, afin de laisser le temps à la molécule de diffuser dans l'explant. La mesure du coefficient de diffusion a ensuite été réalisée en analysant la distribution spatiale de la concentration en fonction du temps (**Matériel & Méthodes, Paragraphe 4.1.2.b**). Dans le cas du colorant, cette distribution de la concentration a été analysée à la surface de la peau, grâce à l'intensité de coloration du colorant. Dans le cas du dextran, le front de concentration a été analysé sur des coupes cryologiques réalisées perpendiculairement à l'épiderme, grâce à l'intensité de fluorescence du dextran.

La première limite commune à ces deux méthodes est que lorsque la biopsie est en flottaison, le flux de matière ne se fait pas suivant une seule direction, des bords de la biopsie vers son centre, mais également par le dessous, de la surface inférieure du derme vers l'épiderme. Nous avons donc fait l'hypothèse que, pour des temps courts, typiquement inférieurs à 24 heures, le flux venant de la surface inférieure de l'explant avait un impact négligeable sur l'intensité de coloration observée à la surface supérieure de la biopsie, ou sur l'intensité de fluorescence du dextran observée sur les bords des coupes cryologiques. Cette hypothèse a été confirmée pour le colorant, grâce au modèle numérique développé (**Figure 50**). Afin de réaliser des mesures plus exactes, l'idéal aurait été de mettre en place

un système permettant d'administrer le composé uniquement par les côtés de la biopsie. Dans le cas du dextran, nous aurions également pu imaginer déposer le composé en topique à la surface de la biopsie, en prévenant les fuites grâce au collage de l'anneau en silicone. Cependant, le composé aurait dû traverser chacune des différentes couches de la peau, ce qui aurait faussé les mesures.

La deuxième limite de la méthode réside dans la mesure d'un coefficient de diffusion unique pour l'ensemble de la biopsie. Les explants de peau utilisés peuvent être décomposés en deux couches de compositions différentes : l'épiderme et le derme (**Introduction, Partie 1, Paragraphes 2.1 et 2.2**). De par leurs différences structurelles, il paraît intuitif de considérer que la cinétique de diffusion d'un composé n'est pas la même dans ces deux compartiments. Ces différences de coefficients de diffusion selon les couches de la peau ont été démontrées dans la littérature. Par exemple, Xing et al. ont mesuré les coefficients de diffusion de l'œstradiol (environ 0,3 kDa) dans la peau humaine, et ont trouvé des différences d'un facteur 10 entre la couche cornée, l'épiderme et le derme, la diffusivité étant la plus importante dans le derme ($2 \cdot 10^{-5}$ cm²/h), et la plus faible dans la couche cornée ($1 \cdot 10^{-7}$ cm²/h) (Xing et al. 2009). Le coefficient de diffusion mesuré dans l'épiderme était de $2,1 \cdot 10^{-6}$ cm²/h.

La troisième limite des méthodes expérimentales mises en place concerne la technique basée sur l'utilisation du colorant. Dans ce cas-là, le front de concentration est observé à la surface de la biopsie, et suppose que l'intensité de coloration observée en surface est similaire à celle qui pourrait être observée à n'importe quelle profondeur de la biopsie. Cette hypothèse est toutefois acceptable aux temps courts, comme démontré grâce aux simulations effectuées (**Figure 50**).

Enfin, la dernière limite concerne les variabilités *inter*-donneurs. Les mesures des coefficients de diffusion ont été réalisées sur trois donneurs indépendants dans le cas du colorant, et seulement sur un donneur dans le cas du dextran. De par les différences d'épaisseur et de densité de la peau selon les individus, il existe un coefficient de diffusion unique et propre à chaque tissu. Dans notre cas, des moyennes ont été réalisées sur l'ensemble des répliqués étudiés.

Les coefficients de diffusion moyens obtenus dans les biopsies en flottaison sont de $9,3 \cdot 10^{-7} \pm 2,9 \cdot 10^{-7}$ cm²/s pour le colorant alimentaire d'un poids moléculaire d'environ 1,2 kDa, $1,22 \cdot 10^{-7} \pm 7,33 \cdot 10^{-8}$ cm²/s pour le dextran de 10 kDa et $2,98 \cdot 10^{-8} \pm 1,61 \cdot 10^{-8}$ cm²/s pour le dextran de 40 kDa. Le coefficient de diffusion semble dépendant du poids moléculaire du composé : plus celui-ci est élevé, plus la diffusivité est faible.

Différentes études ont porté sur la mesure de coefficients de diffusion dans la peau. Wonglertnirant et al. ont par exemple mesuré la diffusivité d'un dextran couplé à de la fluoresceine, d'un poids moléculaire de 4,3 kDa, dans de la peau de rat. Le coefficient obtenu était de $1,86 \cdot 10^{-7}$ cm²/s (Wonglertnirant et al. 2010). Cornelissen et al. ont comparé le coefficient de diffusion d'un dextran de 20 kDa dans l'épiderme de la peau humaine et de la peau de cochon. Les résultats obtenus étaient de $6,2 \cdot 10^{-7}$ et $5,9 \cdot 10^{-7}$ cm²/s respectivement. (Cornelissen et al. 2008). Des études plus poussées ont également permis de mesurer des coefficients de diffusion selon les différentes couches de la peau. Römngens et al. ont comparé les valeurs de diffusivité de dextrans de 40 et 500 kDa, dans le derme et dans l'épiderme. Ils ont obtenu des valeurs d'environ $2 \cdot 10^{-7}$ cm²/s dans le derme et $8 \cdot 10^{-8}$ cm²/s dans l'épiderme pour le dextran de 40 kDa, et d'environ $8 \cdot 10^{-8}$ cm²/s aussi bien dans le derme que dans l'épiderme pour le dextran de 500 kDa (Römngens et al. 2015).

Les estimations de coefficients de diffusion obtenues au cours de ce projet semblent cohérentes avec les valeurs de diffusivité décrites dans la littérature. Il est cependant difficile

de comparer précisément les valeurs, étant donné qu'il n'existe pas de relation linéaire entre le coefficient de diffusion et le poids moléculaire d'un composé (Römgers et al. 2015), et que toutes les techniques de mesure utilisées sont différentes.

Le coefficient de diffusion du colorant alimentaire a également été mesuré dans la matrice, afin de pouvoir par la suite développer un modèle numérique de la diffusion d'un composé dans un modèle de peau, en prenant en compte l'ensemble des compartiments qui constituent nos modèles. Le coefficient obtenu est de $1,4 \cdot 10^{-5} \pm 5,7 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$. La matrice étant un hydrogel poreux (composition confidentielle), il est cohérent de trouver un coefficient de diffusion plus élevé que dans la peau.

2. Développement d'un modèle numérique de la diffusion d'un composé dans un modèle de peau

Grâce aux coefficients expérimentaux déterminés pour le colorant alimentaire, un modèle numérique de la diffusion d'un composé a été développé à l'aide du logiciel COMSOL.

La comparaison entre les résultats expérimentaux et la simulation a démontré des cinétiques de diffusion relativement similaires. De plus, la simulation a permis de valider certaines hypothèses émises pour le calcul des coefficients de diffusion.

La simulation de la diffusion n'a été réalisée qu'avec les coefficients de diffusion expérimentaux déterminés pour le colorant alimentaire pour le moment. Afin de valider la simulation, il serait intéressant de simuler la diffusion des dextrans de 10 et 70 kDa. Cela impliquerait de déterminer leur coefficient de diffusion dans la matrice. Cela pourrait être réalisé de la même façon que pour le colorant alimentaire, mais avec une caméra à fluorescence par exemple.

Ce modèle numérique sera un outil particulièrement intéressant pour la prédiction des profils de diffusion de différents composés administrés par la perfusion, en fonction de leur poids moléculaire et de leur diffusivité. Cet outil permettra d'optimiser les plans d'expérience, de limiter le nombre d'échantillons requis et de limiter les coûts en réduisant le nombre d'expériences à réaliser.

3. Perfusion d'un modèle de peau en libre circulation

Afin d'évaluer l'impact de la perfusion sur l'amélioration des échanges dans le tissu, et sur la physiologie de la peau, des premiers essais ont été réalisés, en perfusant des modèles de peau pendant 10 jours à un débit moyen de $2,5 \mu\text{L}/\text{min}$: les modèles ont été perfusés pendant 30 secondes à un débit de $5 \mu\text{L}/\text{min}$, et la perfusion a été arrêtée pendant 30 secondes.

Afin de déterminer les paramètres de perfusion les plus adaptés, de nombreux débits et cycles de perfusion ont au préalable été testés (données non présentées). La première étape a été de comparer différentes conditions d'un point de vue macroscopique, en analysant

visuellement la diffusion d'un colorant à la surface de la peau. Cette méthode d'analyse a l'avantage d'être facile à mettre en œuvre, et permet de réaliser un screening de nombreuses conditions en peu de temps. Nos critères de sélection étaient les suivants : les échanges en colorant entre le perfusé et le tissu doivent être les plus efficaces possibles, sans entraîner de dommages visibles au niveau de la peau.

Un débit moyen de 2,5 $\mu\text{L}/\text{min}$ est cohérent avec les plages de débits utilisées dans la littérature pour des applications telles que de la microdialyse, ou de la microperfusion en libre circulation par exemple, qui sont de l'ordre de 1 à 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ (Holmgaard et al. 2012 ; Bodenlenz et al. 2013, 2017 ; Baumann et al. 2019). De plus, ce faible débit est également cohérent avec les faibles vitesses d'écoulement observées *in vivo* au niveau des capillaires sanguins, permettant de favoriser les échanges entre le sang et le tissu.

L'intérêt d'alterner entre des phases de perfusion et des phases d'arrêt (à débit nul) est de renouveler régulièrement le contenu du cathéter afin de maintenir une concentration quasi constante. Cela permet également de conserver des phases à débit et pression nuls, afin de limiter la possibilité de flux convectif au travers des pores qui, à terme, pourrait endommager le tissu. Le diamètre interne du cathéter étant de 0,9 mm et la longueur de la zone poreuse de 10 mm, le volume de liquide à l'intérieur de cette zone poreuse est de 6,4 μL . 2,5 cycles de perfusion sont donc nécessaires pour renouveler l'ensemble de ce volume, à un débit moyen de 2,5 $\mu\text{L}/\text{min}$.

Une fois ces paramètres sélectionnés, la diffusion des composés perfusés dans la peau via le système de perfusion a été caractérisée grâce aux méthodes d'analyses développées. L'impact de la perfusion sur la physiologie des modèles de peau a été étudiée, à l'aide de différentes techniques histologiques et biochimiques.

Les résultats de ces différentes analyses ont mis en évidence plusieurs points. Tout d'abord, les résultats montrent qu'il est possible de perfuser des explants de peau en culture pendant 10 jours, tout en maintenant la viabilité de la peau, et en conservant l'intégrité de la structure du tissu. Une apoptose est tout de même visible au centre du modèle, au niveau de la zone d'implantation du cathéter, probablement due à l'implantation du dispositif. Des pistes d'amélioration de ce point ont été discutées en première partie de cette discussion. Cependant, les résultats ont également démontré un manque de reproductibilité dans les expériences, entraînant une importante variabilité entre les différents réplicats d'un même donneur, et entre les différents donneurs. De plus, la caractérisation de la diffusion dans la peau a également mis en évidence une diminution des échanges entre le perfusé et le tissu au cours du temps.

Une première hypothèse pouvant expliquer le manque de reproductibilité de la perfusion et la diminution des échanges au cours du temps serait un phénomène de cicatrisation de la peau autour du cathéter, entraînant un colmatage des pores du dispositif. Ce phénomène, caractéristique de la réponse inflammatoire à un corps étranger, a été étudié dans la littérature, notamment pour les membranes des sondes de microdialyse (**Partie 1, Paragraphe 2.2**).

Une deuxième hypothèse serait que ces variabilités sont dues à des différences de morphologie du tissu entre les donneurs, et au sein d'un même donneur, entre les différentes biopsies. En effet, l'épaisseur, la tonicité ou la densité du derme de la peau peut varier d'un

donneur à l'autre en fonction de divers paramètres comme l'âge par exemple. De même, ces paramètres peuvent varier au sein d'un même échantillon, en fonction de la zone anatomique par exemple. Ces variabilités peuvent poser problèmes pour du screening de molécules à haut débit, mais peuvent également être un avantage puisqu'elles sont représentatives des variabilités observées *in vivo* entre les différents individus (Mathes et al. 2014).

4. Perspectives d'amélioration des paramètres de perfusion pour favoriser les échanges de manière significative et améliorer la reproductibilité des expériences

4.1 Modulation des différences de pression entre l'intérieur du cathéter et le tissu

Le dispositif microporeux utilisé au cours de ce projet a un diamètre interne élevé, de 0,9 mm. La résistance hydrodynamique du cathéter est similaire à celle des tubes utilisés pour sa connection. La perte de charge induite par le cathéter est donc négligeable, et la pression est peu impactée par le cathéter qui ne s'oppose pas au passage du fluide. Les pores présents sur la paroi des cathéters ont également un diamètre important, de 50 μm , ce qui nous permet de négliger l'influence de la pression osmotique

De ce fait, dans le cas où l'on considère la possibilité d'un flux convectif par les pores du cathéter, seule la différence de pression entre l'intérieur du cathéter et le tissu joue un rôle dans les phénomènes de transport de matière dans notre configuration.

Au cours de ce projet, nous nous sommes aperçus que la pression hydrostatique tenait un rôle majeur dans les phénomènes d'échange entre le perfusé et le tissu. En effet, lorsque le réservoir de récupération est placé en hauteur par rapport au cathéter dans l'incubateur, le perfusé ne parvient pas à circuler jusqu'au réservoir de récupération : tout le liquide s'écoule dans la biopsie par les pores du cathéter, induisant d'importantes fuites vers la matrice ainsi qu'un potentiel gonflement de la peau. Cela est dû à une différence de pression positive entre l'intérieur du cathéter et le tissu qui engendre un flux convectif du perfusé. La configuration de notre système fait qu'il est difficile de placer le réservoir de récupération exactement au même niveau que le cathéter, celui-ci a donc été placé à un niveau inférieur par rapport au dispositif poreux, induisant une différence de pression négative entre l'intérieur du cathéter et le tissu. Cette différence de pression négative ne favorise pas le passage des molécules à travers les pores du cathéter, ce qui pourrait être une hypothèse supplémentaire expliquant les problèmes rencontrés au cours de nos expériences.

L'impact des variations de pression sur le transport de masse a été reporté dans la littérature, notamment dans le cas de la microdialyse avec des membranes ayant des limites de porosité importantes, de plus de 100 kDa (Hsiao et al. 1990; Jadhav et al. 2016).

Lors de l'utilisation de sondes de microdialyse avec des limites de porosité inférieures à 100 kDa, le gradient de concentration régit le transport de matière par diffusion passive, selon la loi de Fick. En revanche, lorsque la porosité augmente, le transport à travers la membrane par convection n'est plus négligeable. Les membranes sont donc plus sensibles aux variations de pression (Jadhav et al. 2016). Deux problèmes ont alors été rencontrés :

la perte de liquide depuis le perfusat vers le tissu, et la difficulté à échantillonner des molécules du tissu vers le perfusat (Jadhav et al. 2016).

Trois solutions ont été envisagées. La première consiste à minimiser les effets de la pression osmotique en ajustant constamment cette pression dans le perfusat, afin qu'elle soit à l'équilibre avec celle du tissu. Pour cela, des agents osmotiques ou des protéines peuvent y être ajoutés, tels que du dextran-70 ou de la BSA (Li et al. 2008). La deuxième option consiste à utiliser la différence de pression hydrostatique pour favoriser le transport des molécules depuis le tissu vers le perfusat. Dans ce cas, le problème inverse se pose et le risque est d'entraîner une perte de liquide depuis le perfusat vers le tissu. La troisième option consiste à moduler le type de pompage. Traditionnellement, un pompage en injection est utilisé, c'est-à-dire en poussant le liquide. La pression à l'intérieur de la sonde est donc plus élevée que la pression dans le tissu, ce qui entraîne une perte de fluide depuis le perfusat vers le tissu. Le pompage en aspiration a donc été testé. Toutefois, celui-ci entraîne une perte de fluide depuis le tissu vers le perfusat, à cause de la différence de pression négative entre l'intérieur de la sonde et le tissu. Afin d'éviter ces phénomènes, une solution consiste donc à combiner les deux techniques de pompage, c'est-à-dire à pousser le fluide dans la sonde et à l'aspirer à la sortie de la sonde. La différence de pression transmembranaire est en moyenne égale à zéro, ce qui permet d'éviter une perte de fluide dans un sens ou dans l'autre (Li et al. 2008). Cette configuration pose toutefois un problème de complexité du système et d'augmentation du coût.

En considérant l'ensemble de ces observations, nous avons émis l'hypothèse que l'induction d'une différence de pression entre l'intérieur du cathéter et le tissu de façon périodique pourrait permettre de favoriser la convection du fluide à travers les pores, et ainsi de limiter d'éventuelles obstructions (par exemple causées par des débris cellulaire), tout en évitant une perte de liquide trop importante, qui pourrait être à l'origine de fuites et de gonflement des explants.

Pour ce faire, nous avons choisi d'utiliser une vanne trois voies en sortie du dispositif poreux. Lorsque cette vanne est ouverte, le perfusat s'écoule normalement dans le réservoir de récupération. Lorsque cette vanne est fermée, les seules issues possibles sont les pores du cathéter. Afin de rester cohérents avec les débits utilisés jusqu'alors, nous avons décidé de conserver un débit constant de 2,5 $\mu\text{L}/\text{min}$, et de faire varier la durée durant laquelle la vanne est fermée.

Ces tests sont actuellement en cours, mais les premiers résultats ont montré d'importantes variabilités *intra* et *inter*-donneurs, nous empêchant de conclure quant aux meilleurs paramètres à appliquer pour le moment. En effet, des fuites du perfusat ont été observées sur certains réplicats, principalement au niveau de la zone d'insertion du cathéter (**Figure 70**).

Une des hypothèses émises pour justifier ces observations serait que ces fuites sont dues aux dommages au tissu causés par l'implantation du cathéter, créant ainsi des chemins privilégiés par lesquels le fluide s'écoule. Cette hypothèse a été discutée dans la première partie de cette discussion.

La deuxième hypothèse rejoint celle déjà formulée dans le paragraphe 2.3 de cette partie, et concerne les différences de morphologie du tissu entre les donneurs.

Une sonde colorée ou fluorescente qui n'a pas d'impact négatif sur la physiologie de la peau pourrait être diluée dans le perfusat et injectée dans le modèle afin de servir de contrôle

qualité de l'efficacité des échanges dans le modèle de façon systématique. En effet, le milieu de culture étant transparent, il est plus compliqué de détecter les variabilités entre les différents réplicats que lors de l'utilisation du colorant alimentaire. Cette sonde doit pouvoir être visualisée en dynamique, sans avoir à passer par des coupes histologiques ou toute autre technique d'analyse destructive. L'utilisation d'une sonde utilisée en chirurgie plastique pour visualiser la perfusion dans les lambeaux perforants pourrait être utilisée, telle que le vert d'indocyanine par exemple (Steinbacher et al. 2017).

4.2 Implantation de plusieurs dispositifs poreux

Afin de garantir un approvisionnement rapide de l'ensemble de la surface des explants de peau, l'implantation de plusieurs dispositifs poreux au sein d'une même biopsie pourrait être envisagée. Cela nécessiterait cependant d'avoir des dispositifs d'un diamètre bien inférieur à celui utilisé actuellement. En effet, nous avons démontré que l'implantation du cathéter dans le derme des biopsies de peau entraînait une perte de l'intégrité du tissu au niveau de la zone d'implantation. Cette zone ne peut donc pas être prise en compte lors des analyses. Dans le cas où plusieurs dispositifs sont implantés dans une même biopsie, cette zone d'implantation devrait donc être réduite au maximum afin de conserver une surface analysable conséquente.

Partie 3. Perspectives d'applications du modèle FlowSkin

Le modèle FlowSkin a été développé dans le but d'améliorer les échanges au sein du tissu, qui étaient jusqu'alors limités de par l'absence de vascularisation fonctionnelle. A ce jour, le modèle est encore en développement, et un manque de reproductibilité dans les expériences doit encore être résolu. Différentes propositions d'amélioration du système ont été discutées dans les deux premières parties de cette discussion.

Nous allons maintenant développer les différentes applications envisagées pour le modèle FlowSkin. Cette partie reposera principalement sur des connaissances théoriques, ces différentes applications n'ayant pas encore pu être expérimentées.

1. Prolongation de la durée de vie des modèles de peau *ex vivo*

Un des objectifs principaux de la perfusion intra-tissulaire d'un modèle *ex vivo* de peau humaine est de favoriser l'approvisionnement en nutriments et en oxygène du tissu, mais aussi l'élimination des déchets métaboliques.

De ce fait, la première application envisagée pour le modèle FlowSkin est la prolongation de la durée de vie des modèles de peau *ex vivo*.

Actuellement, le modèle NativeSkin® est validé et commercialisé pour des temps de culture allant jusqu'à sept jours. Au cours de ce projet, nous avons démontré qu'il était possible de cultiver ces modèles de peau jusqu'à dix jours, tout en conservant l'intégrité de la structure du tissu, la viabilité cellulaire et la prolifération des cellules de l'épiderme (**Résultats, Partie 3, Paragraphe 2.2**). En revanche, des études internes réalisées sur 14 jours ont révélé une perte de l'intégrité de la structure du tissu, caractérisée par une apoptose massive des cellules de l'épiderme (données non présentées).

Cette période relativement courte peut être suffisante pour étudier les effets de certains médicaments sur la peau, mais peut s'avérer limitante lorsque la durée du traitement est plus longue, ou pour l'étude d'applications répétées du médicament par exemple. La prolongation de la durée de vie des modèles de peau serait donc une réelle opportunité pour l'entreprise et pourrait permettre d'étendre les possibilités d'utilisation de ces modèles.

Les résultats obtenus au cours de ce projet ne permettent pas de conclure quant à l'impact de la perfusion sur la prolongation de la durée de vie des modèles : aucune différence significative n'a été observée entre les modèles perfusés et les modèles NativeSkin® contrôles. Le manque de reproductibilité de la perfusion et les dommages causés par l'implantation du cathéter sur le tissu pourraient en partie expliquer cette absence d'effet.

Un autre aspect très important pour la viabilité du tissu et qui n'a pas été étudié au cours de ce projet est l'approvisionnement en oxygène. Différentes méthodes ont été décrites dans la littérature pour améliorer la capacité du milieu de culture à transporter l'oxygène dans des tissus *in vitro* (Malda et al. 2007).

Les perfluorocarbones (PFC) peuvent par exemple être ajoutés au milieu de culture. Composés de chaînes de carbones fluorés, leurs propriétés font d'eux de très bons transporteurs d'oxygène pour des applications biologiques (Farris et al. 2016). En effet, les perfluorocarbones sont inertes de par la force de leurs liaisons C-F, et sont donc biocompatibles. Ils sont également hydrophobes et lipophobes, et sont capables de s'autoassembler en solution aqueuse, ce qui contribue à leur stabilité structurale dans les tissus. Enfin, leur faible polarisabilité et le fait qu'ils soient miscibles avec les gaz non polaires leur confère la capacité de dissoudre le dioxygène en le piégeant physiquement via les forces de Van der Waals. Les perfluorocarbones sont capables de stocker le dioxygène et de le libérer dans un tissu en fonction de ses demandes métaboliques. L'intérêt de l'ajout de perfluorocarbones dans le milieu de culture pour améliorer le transport d'oxygène dans des tissus *in vitro* a été démontré dans de nombreuses études (Radisic et al. 2006 ; Tan et al. 2009).

Un autre type de transporteurs d'oxygène basé sur l'hémoglobine (HbOCs pour *Heglobin-based Oxygen Carriers* en anglais) peut être utilisé. Ces transporteurs sont constitués d'hémoglobines extraites de globules rouges humains ou mammifères, et fonctionnent de la même façon que les hémoglobines *in vivo* : le changement de conformation de ces dernières permet la fixation et la libération spécifique du dioxygène, lorsque le tissu est en conditions hypoxiques (Farris et al. 2016). Leur efficacité a été démontrée pour la maintenance de tissus *in vitro* (Chen and Palmer 2010). Cependant, des études ont également prouvé que leur oxydation pouvait entraîner la production de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS pour *Reactive Oxygen Species* en anglais) (Chen and Palmer 2010). L'utilisation de nouvelles hémoglobines a alors été étudiée afin de pallier ces problèmes. Par exemple, la société Hemarina développe différents produits basés sur l'utilisation d'une hémoglobine issue des vers arénicoles. Les avantages de cette hémoglobine sont qu'elle est naturellement extra-cellulaire donc universelle, elle est capable de lier 40 fois plus d'oxygène que l'hémoglobine humaine et elle est complètement autonome puisqu'elle ne nécessite pas de cofacteurs pour fonctionner (Rodriguez-Brotons et al. 2016 ; Le Pape et al. 2017, 2018 ; Mouré et al. 2019).

La supplémentation du milieu de culture avec un de ces transporteurs d'oxygène et la perfusion de celui-ci dans les explants de peau grâce au système FlowSkin pourrait permettre d'améliorer l'approvisionnement du tissu en oxygène et ainsi, peut-être, permettre la prolongation de sa durée de vie.

2. Amélioration du transport de molécules dans le tissu

Une deuxième application envisagée pour le modèle FlowSkin est l'amélioration du transport de molécules de hauts poids moléculaires dans le tissu. Nous proposons de décrire, à titre d'exemple, une expérience réalisée au cours de ce projet de thèse, mais n'ayant pas été présentée dans ce manuscrit.

Le modèle InflammSkin®, développée par la société Genoskin, est un modèle d'inflammation cutanée (Jardet et al. 2020). Ce modèle est obtenu en deux étapes. La première consiste à activer les cellules T résidentes *in situ* par injection intradermique d'anticorps anti-CD3 et anti-CD28. Les cellules Th17 sont ensuite polarisées. Pour cela,

le modèle est cultivé durant sept jours dans un milieu de culture supplémenté avec un cocktail de cytokines pro-inflammatoires, composé d'IL-1 β , d'IL-23 et de TGF- β .

Ce modèle permet de reproduire certains aspects de la réponse inflammatoire observée dans les lésions psoriasiques, telles que la perte de l'intégrité de la structure de l'épiderme, la surexpression du marqueur d'hyperprolifération Kératine-16 (K16) et de la psoriasine (S100A7), ainsi que la sécrétion d'IL-17A, d'IL-17AF, d'IL-17F, IL-22 et IFN- γ . Le modèle InflammSkin® est donc un outil permettant d'évaluer l'efficacité de composés anti-inflammatoires.

Des variabilités ont été observées au niveau de la réponse inflammatoire selon les donneurs, mesurée en interne par le dosage de la concentration en IL-22 sécrétée. En dessous d'une certaine concentration, le donneur est considéré comme non répondant, et ne peut pas être exploité. Différentes hypothèses peuvent expliquer ces variabilités, dont l'approvisionnement insuffisant en cocktail pro-inflammatoire dans la peau, potentiellement du au poids moléculaire important des différents composés (55 kDa pour l'IL-23, 17,5 kDa pour l'IL-1 β et 25 kDa pour le TGF- β).

L'administration en continu de ce cocktail pro-inflammatoire, via le système de perfusion du modèle FlowSkin, et en complément de sa diffusion passive depuis le milieu de culture vers le tissu par la membrane poreuse, pourrait permettre d'améliorer l'approvisionnement de l'explant, notamment durant les premières heures suivant l'activation des cellules T résidentes, ce qui pourrait être un élément clé de la réponse inflammatoire des donneurs.

Cela a été testé sur cinq donneurs indépendants (données non présentées). Les résultats n'ont montré aucune différence significative entre les modèles perfusés et les modèles InflammSkin® contrôles, au niveau de l'intégrité de la structure de l'épiderme, ou de l'expression des marqueurs K16 et S100A7. En revanche, pour deux donneurs sur les cinq étudiés, le dosage de la concentration en IL-22 a révélé une sécrétion plus importante pour les modèles perfusés que pour les modèles InflammSkin® contrôles, durant les premières 24 heures de culture, et ce jusqu'au septième jour de culture.

Les résultats obtenus ne permettent donc pas de conclure quant au réel impact de la perfusion du cocktail de cytokines sur la réponse inflammatoire des modèles de peau. Les variabilités observées entre les donneurs pourraient en partie être expliquées par les problèmes de reproductibilité de la perfusion discutées au cours de ce manuscrit. En effet, il est possible que la perfusion n'ait pas été efficace pour certains donneurs, d'où l'absence de différence observée entre la sécrétion d'IL-22 par les modèles perfusés et par les modèles InflammSkin® contrôles.

Une fois les problèmes de reproductibilité rencontrés dans nos expériences résolus, il pourrait être intéressant de reproduire cette étude. En revanche, il serait nécessaire de prendre en compte la réaction inflammatoire potentielle du tissu suite à l'implantation du cathéter (**Partie 1, Paragraphe 2.2**).

Cette application pourrait également être particulièrement intéressante pour améliorer le transport de biomédicaments, tels que les anticorps monoclonaux par exemple, qui ont des poids moléculaires de l'ordre de 150 kDa.

3. Evaluation de la toxicité, l'innocuité ou l'efficacité de médicaments administrés par voie systémique

Traditionnellement, l'évaluation de la toxicité, de l'innocuité ou de l'efficacité de médicaments sur des modèles *in vitro*, que ce soit des cultures de cellules, des tissus reconstruits ou des explants, se fait par le biais du milieu de culture. Le composé à tester est ajouté à celui-ci, et diffuse passivement dans le modèle en question. Ce procédé d'administration est censé reproduire l'administration systémique du médicament, c'est-à-dire son administration via la circulation sanguine.

Seulement 5 % des composés testés à la première phase des études cliniques parviennent à obtenir une autorisation de mise sur le marché (Moreno and Pearson 2013). Ce taux d'attrition très élevé est un des problèmes majeurs rencontrés durant le processus de développement d'un médicament, et génère des coûts considérables. Dans la majorité des cas, ce taux d'échec est dû à un manque d'efficacité de la molécule, ou à sa toxicité. Afin de pallier ce problème, une des solutions consiste à développer des modèles pré-cliniques plus prédictifs des réponses humaines à un médicament.

L'utilisation de la perfusion intra-tissulaire pour l'administration de composés pourrait permettre d'être plus fidèle à la distribution tissulaire des médicaments ayant lieu *in vivo*, et ainsi d'avoir un modèle plus pertinent pour l'évaluation de la toxicité, de l'innocuité ou de l'efficacité de molécules durant les phases pré-cliniques.

4. Evaluation de la biodisponibilité, la distribution ou la pénétration cutanée de médicaments

Au niveau cutané, différents modes d'administration de médicaments peuvent être envisagés : une application topique, une injection intradermique, ou une injection sous-cutanée par exemple. L'évaluation de la biodisponibilité, de la distribution ou de la pénétration d'un médicament sont des paramètres fondamentaux dans le domaine de la pharmacocinétique.

La microdialyse ou la microperfusion en libre circulation sont des techniques couramment utilisées pour ce type d'études (Müller et al. 1997 ; Benfeldt et al. 2007 ; Dragatin et al. 2016). Ces méthodes d'échantillonnage, utilisées principalement *in vivo*, présentent certaines limites. Bien que peu invasives, elles nécessitent tout de même l'implantation de plusieurs sondes dans la peau de patients. De plus, elles ne sont pas adaptées à des échantillonnages sur de longues durées.

L'utilisation du système FlowSkin pour l'échantillonnage du fluide interstitiel suite à l'administration d'un composé, appliqué en topique ou bien injecté en sous-cutanée ou en intra-dermique, pourrait permettre, sur le même principe que la microdialyse ou la microperfusion en libre circulation, d'étudier les phénomènes de biodisponibilité, de distribution tissulaire ou de pénétration cutanée de diverses molécules. Cependant, la collecte de composés est un aspect qui a peu été étudié au cours de cette thèse, et des modifications devraient être apportées au niveau des paramètres de perfusion. La

perfusion par aspiration pourrait par exemple être envisagée, afin d'induire une différence de pression négative entre l'intérieur du cathéter et le tissu et ainsi forcer la convection du fluide interstitiel vers le perfusé.

5. Evaluation des réponses inflammatoires

Suite à une infection par un microorganisme, une agression chimique ou physique, une réaction inflammatoire peut survenir. Le nombre de cellules immunitaires résidentes dans le tissu étant limité, ce processus nécessite le recrutement des cellules immunitaires présentes dans la circulation sanguine. Pour cela, des chimiokines sont produites, attirant les globules blancs vers le site d'intérêt. Cette étape est accompagnée de la modification de la paroi des vaisseaux sanguins au voisinage de la lésion (Cavaillon 2020).

Une application envisagée pour le modèle FlowSkin pourrait être l'étude des réactions inflammatoires suite à une infection ou à une agression extérieure. Pour cela, le système de perfusion pourrait être utilisé afin de faire circuler du sang du donneur dans le tissu.

CONCLUSION

L'objectif de ce projet de thèse était de développer, valider et caractériser un modèle *ex vivo* de peau humaine perfusé intitulé FlowSkin. Le but de cette perfusion intra-tissulaire était de permettre l'administration, la diffusion et la collecte de composés sur plusieurs jours, afin de favoriser les échanges de nutriments, d'oxygène ou de médicaments, mais également l'élimination des déchets métaboliques. La stratégie envisagée reposait sur l'implantation d'un dispositif poreux dans le derme du modèle *ex vivo* de peau humaine NativeSkin®, développé par la société Genoskin, et sa perfusion à l'aide d'un système microfluidique.

Les travaux réalisés au cours de ce projet ont permis d'aboutir à différents résultats. Tout d'abord, un procédé a été développé, permettant de recréer un flux de liquide au sein d'un explant de peau pouvant être cultivé pendant plusieurs jours dans des conditions de culture classiques. Cela a impliqué le développement d'un dispositif microporeux, la mise en place d'une stratégie permettant son implantation dans le derme de l'explant de peau, et le développement d'un système permettant de maintenir le modèle perfusé en culture pendant plusieurs jours dans des conditions de culture classiques. Un système de perfusion automatisé a été mis en place, permettant l'analyse de 16 échantillons en parallèle. Le modèle FlowSkin ainsi obtenu a été breveté en 2020 par la société Génoskin. En parallèle, différentes méthodes d'analyse ont été développées, permettant de visualiser et/ou quantifier de façon dynamique la distribution spatiale et la concentration de différents composés dans la peau. Parmi ces méthodes d'analyse, l'utilisation de la radiographie et de la tomographie à rayons X a notamment permis l'analyse en temps réel et en trois dimensions de la diffusion d'un composé au sein des modèles de peau. L'utilisation de colorants puis de dextrans couplés à des fluorophores a quant à elle permis d'évaluer les variations des profils de diffusion dans les biopsies de peau en fonction du poids moléculaire des composés. Enfin, un modèle numérique permettant de simuler la diffusion d'une molécule dans les modèles de peau a été développé, grâce à des coefficients de diffusion expérimentaux mesurés expérimentalement.

La caractérisation des effets de la perfusion sur la physiologie des modèles de peau a démontré la possibilité de perfuser les explants jusqu'à 10 jours, sans altérer de façon significative la viabilité ou la structure du tissu. Les résultats ont tout de même montré une perte de viabilité de la peau au centre de l'explant, au niveau de la zone d'implantation du cathéter.

De plus, la caractérisation de la diffusion dans les modèles perfusés a mis en évidence plusieurs phénomènes. Il a été démontré que des échanges avaient bien lieu entre le perfusé et le tissu au niveau des pores du cathéter, et ce tout au long de la culture. Cependant, ces échanges ne se sont pas avérés efficaces pour tous les réplicats étudiés. Une diminution de ces échanges a également été observée au cours de la culture. Enfin, les résultats obtenus ont montré que ce mode de perfusion ne permettait pas de démontrer, pour l'instant, la diffusion de composés de haut poids moléculaire (70 kDa) depuis les pores du cathéter vers le tissu.

Afin de favoriser la convection à travers les pores du cathéter et ainsi potentiellement améliorer les échanges entre le perfusé et le tissu, une stratégie basée sur l'induction d'une surpression dans le cathéter a été développée. Seulement quelques expériences ont pu être réalisées afin de tester cette hypothèse, mais les premiers résultats ont révélé un manque de reproductibilité, caractérisé par des fuites du perfusé au niveau de la zone d'insertion pour certains réplicats, ainsi que le gonflement de certaines biopsies.

Différentes hypothèses ont été émises, afin d'expliquer l'ensemble des problèmes rencontrés au cours de ce projet :

- La peau n'est pas la même d'un patient à l'autre, de par son épaisseur ou sa tonicité, mais elle est également susceptible de varier d'une biopsie à l'autre,
- La technique d'implantation du dispositif poreux est peu reproductible : elle ne permet pas d'implanter le cathéter de façon contrôlée au niveau de la profondeur dans le tissu,
- La technique d'implantation du dispositif induit des lésions affectant la structure du tissu et le diamètre externe du cathéter est élevé, entraînant une déformation de la biopsie une fois implanté,
- L'implantation du cathéter entraîne potentiellement une réaction inflammatoire dans le tissu, provoquant un phénomène de cicatrisation susceptible de colmater les pores au cours de la culture,
- La zone poreuse du cathéter est trop longue par rapport au diamètre de la biopsie, favorisant les fuites par la zone d'insertion.

A l'issue de ce projet, il serait donc nécessaire de poursuivre les expériences afin d'améliorer la reproductibilité de la perfusion et de favoriser les échanges entre le perfusé et le tissu, et de pouvoir par la suite envisager diverses applications. Différentes pistes intéressantes ont été discutées :

- L'amélioration de la technique d'implantation du cathéter et du procédé de production du modèle, afin d'éviter au maximum les dommages au tissu causés par le cathéter,
- La diminution du diamètre externe du dispositif poreux, en utilisant une sonde de microperfusion en libre circulation par exemple,
- La diminution de la longueur de la zone poreuse,
- L'amélioration d'un outil de guidage permettant une implantation contrôlée du dispositif dans la biopsie,
- L'induction d'une légère surpression dans le cathéter, afin de favoriser la convection du perfusé par les pores sans toutefois endommager le tissu,
- L'implantation de plusieurs dispositifs poreux au sein d'une même biopsie,
- L'utilisation d'une sonde présente dans le perfusé afin d'avoir un contrôle qualité en temps réel permettant d'identifier directement les problèmes rencontrés au cours d'une expérience.

Malgré le fait que des améliorations sont nécessaires afin de gagner en reproductibilité, le modèle FlowSkin développé au cours de ce projet de thèse est un des seuls modèles *ex vivo* permettant l'administration de composés via un flux intra-tissulaire. L'amélioration du système actuel pourrait permettre d'améliorer les échanges en nutriments et en oxygène ainsi que l'élimination des déchets métaboliques, afin de potentiellement prolonger la durée de vie des modèles. Le modèle FlowSkin serait un outil pertinent afin d'évaluer la toxicité, l'innocuité ou l'efficacité de composés, notamment de hauts poids moléculaires, mais également la biodisponibilité, la distribution ou la pénétration cutanée de médicaments.

MATÉRIEL & MÉTHODES

1. Production des modèles NativeSkin® et FlowSkin

1.1 Préparation de la peau

Les échantillons de peau utilisés pour la production des modèles *ex vivo* ont été obtenus à partir de donneurs sains ayant subi une dermolipéctomie abdominale. Ces individus ont signé au préalable un consentement éclairé, dans le plein respect de la Déclaration d'Helsinki. Genoskin détient l'autorisation du Comité de Protection des Personnes et du Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur pour utiliser des échantillons de peau humaine à des fins scientifiques.

Les échantillons de peau ont été collectés et utilisés dans les 24 heures suivant la chirurgie. Avant toute manipulation, l'absence d'infection aux virus HIV1/2, à l'Hépatite B et à l'Hépatite C a été vérifiée à l'aide de tests de dépistages rapides (VIKIA HIV1/2, Biomérieux ; VIKIA HBsAg, Biomérieux ; ORAQUICK HCV, Méridian) à partir du sang du donneur.

La peau a été dégraissée afin de ne conserver que les couches de derme et d'épiderme, puis nettoyée dans deux bains successifs de PBS (Phosphate Buffered Saline 1X) (Dominique Dutscher) supplémenté par 1 % d'un mélange de Pénicilline et de Streptomycine (Pan Biotech) et 0,5 % d'Amphotéricine B (Dominique Dutscher).

Des biopsies circulaires de 15 mm de diamètre ont été produites à l'aide d'un emporte-pièce. Ces biopsies ont été placées en flottaison sur de l'HBSS (Hank's Buffered Salt Solution 1X) (Pan Biotech) supplémenté par 1 % d'un mélange de Pénicilline et Streptomycine, 0,2 % d'Amphotéricine B et 0,2 % de Gentamycine (Dominique Dutscher) jusqu'à leur utilisation.

1.2 Préparation des dispositifs poreux

1.2.1. Sondes de microdialyse

Les sondes de microdialyse utilisées au cours de ce projet sont les CMA 31 Linear Microdialysis Probe (Harvard Apparatus) (**Figure 28**). Elles sont composées d'un tube en polyimide et d'une portion de fibre creuse semi-perméable en polyethersulfone de 10 mm de long. Le diamètre interne de la sonde est de 190 µm et son diamètre externe est de 260 µm. La membrane a une limite de porosité (cut-off) de 55 kDa. Ces sondes commerciales sont prêtes à l'emploi. Elles possèdent un connecteur de type luer lock femelle.

1.2.2. Cathéters poreux

Les cathéters utilisés sont des cathéters veineux périphériques commerciaux (Introcan Certo®, B-Braun) de 20 G. Ces dispositifs en polyuréthane siliconé ont un diamètre externe de 1,1 mm, un diamètre interne de 0,9 mm et une longueur de 32 mm. Ils possèdent un connecteur de type luer lock femelle. Ces dispositifs intègrent 4 bandes radio-opaques le long du corps du cathéter pour leur reconnaissance radiographique (**Figure 29.A**).

Des pores ont été réalisés sur une longueur de 10 mm sur les quatre faces du cathéter, en spirale, par ablation laser. Deux types d'usinage ont été réalisés.

d. Premier type d'usinage

Le premier type d'usinage a été réalisé à l'atelier du LAAS-CNRS en collaboration avec Xavier Dollat, à l'aide d'un système de gravure par ablation laser FineMarker Hybrid (Trotec). Le laser est un laser à CO₂ d'une puissance comprise entre 25 et 30 W. Les cathéters ont été placés sur la trajectoire du laser qui est suffisamment puissant pour percer la tubulure plastique, sans endommager l'aiguille.

Des pores d'un diamètre d'environ 400 µm ont été créés. Les pores ont été espacés de 3 mm sur une même face et décalés de 0,8 mm à chaque rotation de 90° (**Figure 29.C**).

Les pores obtenus ont été caractérisés à l'aide d'un MEB (Microscope électronique à Balayage) S-3700N (Hitachi) (**Figure 29.D**).

e. Deuxième type d'usinage

Le deuxième type d'usinage a été développé avec l'entreprise ALPhaNOV (Bordeaux) dans le cadre d'un contrat de prestation. Le laser utilisé est de type Tangerine HP (Amplitude Systèmes) : c'est un laser femtoseconde infrarouge (longueur d'onde de 1030 nm) qui délivre des impulsions de 350 fs. La cadence de tir du laser a été réglée à 10 kHz, avec une énergie-impulsion de 30 µJ. Le cathéter a été déposé à l'horizontal, perpendiculairement au faisceau. Celui-ci a été dirigé par un scanner galvanométrique et par une lentille de focalisation F-Thêta avec une distance focale de 100 mm, permettant de détourner les pores.

Des pores d'un diamètre de 50 µm ont été créés. Les pores ont été espacés de 0,8 mm sur une même face et décalés de 0,2 mm à chaque rotation de 90° (**Figure 30.C**).

Les pores obtenus ont été caractérisés à l'aide d'un microscope de mesure MF-A1010D (Mituyoto) équipé d'un calculateur QM-Data 200 (Mituyoto) (**Figure 30.D**).

1.3 Implantation des dispositifs poreux

Les dispositifs poreux ont été implantés dans le derme des biopsies de peau de 15 mm de diamètre, parallèlement à la surface et de façon traversante, la partie poreuse centrée dans la biopsie.

1.3.1. Sondes de microdialyse

Les sondes de microdialyse ont été implantées à l'aide des aiguilles guides fournies. Ces aiguilles de 23 G ont un diamètre supérieur à celui des sondes (0,6 mm de diamètre externe et 0,3 mm de diamètre interne). Elles ont été implantées dans le derme des biopsies, puis les sondes ont été insérées à l'intérieur des aiguilles. Ensuite, les aiguilles ont été retirées et seules les sondes sont restées en place dans la peau.

1.3.2. Cathéters poreux

L'implantation a été réalisée manuellement, à l'aide d'une pince courbe (**Figure 31**), ou bien en utilisant un outil de guidage imprimé en 3D (**Figure 32**).

Cet outil a été dessiné à l'aide du logiciel FreeCad, puis imprimé en 3D par stéréolithographie à l'aide d'une DWS 29J+ (DWS), dans une résine photosensible, la DS3000 (DWS). Cette étape d'impression a été sous-traitée au MultiFab du LAAS-CNRS (<https://www.laas.fr/projects/MultiFAB/>).

L'implantation est possible grâce aux aiguilles biseautées sur lesquelles sont montés les cathéters. Une fois implantées, les aiguilles ont été retirées et seules les tubulures plastiques sont restées dans la peau. Les étapes de l'implantation des cathéters sont décrites dans la Partie 1 des Résultats de ce manuscrit (**Paragraphe 2.1**).

1.4 Adaptation des consommables pour la culture du modèle FlowSkin

1.4.1. Création de supports de culture en PDMS

Afin de permettre la culture du modèle perfusé, des supports de culture ont été spécialement créés. Pour cela, un moule a été dessiné à l'aide du logiciel FreeCad, puis imprimé en 3D par stéréolithographie dans une résine photosensible, la DS3000 (DWS), à l'aide d'une DWS 29J+ (DWS) (**Figure 38**). L'étape d'impression 3D a été réalisée au sein de la plateforme MultiFab du LAAS-CNRS.

Une solution de PDMS Sylgard 184 (Dow Corning) a été préparée en mélangeant une base et un durcisseur à un ratio 10 : 1. Une fois bien mélangée, la solution de PDMS a été dégazée sous vide, puis coulée dans le moule. Les moules ont été placés dans une étuve à 60°C pendant 12 heures pour que le PDMS réticule.

Une fois démoulés, un traitement des supports de culture a été réalisé afin d'éviter l'adsorption des molécules hydrophobes. Pour cela, une solution de BSA (Bovine Serum Albumine) (H2B) à 4,5 g/L dans du PBS a été déposée dans le puits des supports de culture. Ils ont ensuite été placés à 37°C pendant 12 heures, puis rincés avec du PBS.

Des aiguilles ont été insérées dans la paroi des supports de culture afin de pouvoir connecter les modèles de peau au reste du système microfluidique (**Figure 41**).

1.4.2. Modification des inserts de culture

Afin de permettre le passage du cathéter, les inserts traditionnellement utilisés pour la culture des modèles NativeSkin® ont dû être modifiés (**Figure 40**). Des fentes ont été créées de part et d'autre de l'insert à l'aide d'une scie, sur une profondeur d'environ 1 cm et une largeur d'environ 2 mm.

1.5 Montage des modèles de peau

Les modèles NativeSkin® et FlowSkin ont été produits selon le procédé de mise en culture des modèles NativeSkin® breveté par Genoskin (EP2882290B1).

Des anneaux en silicone d'un diamètre interne de 12 mm et d'un diamètre externe de 15 mm ont été collés à l'aide d'une colle silicone (procédé propriétaire) à la surface des biopsies de peau.

Dans le cas des modèles FlowSkin, un tube en silicone d'un diamètre interne de 1/16" et d'une longueur d'environ 2 mm a été connecté à l'extrémité sortante du cathéter. Un tube identique a été connecté à l'embout luer lock femelle du cathéter à l'aide d'un connecteur de type luer lock male.

Les explants ont ensuite été déposés en flottaison sur une matrice liquide développée par Genoskin, dans des inserts de culture (Greiner). Les supports de culture contenant les inserts ont été placés à 4°C pendant 10 minutes afin que la matrice solidifie. De la colle silicone a été placée sur la matrice et sur les anneaux afin de solidifier les modèles FlowSkin et rendre leur manipulation plus aisée.

2. Culture des modèles NativeSkin® et FlowSkin

2.1 Mise en place du système de perfusion

Une fois le modèle FlowSkin produit, les tubes silicone reliés au cathéter ont été connectés aux aiguilles insérées dans la paroi des supports de culture en PDMS.

Un pousse-seringue (neMESYS, Cetoni GmbH) équipé d'une seringue de 10 mL (Terumo) a été utilisé pour la perfusion des modèles de peau. Huit pousse-séringes peuvent être pilotés en parallèle par la même unité de contrôle, à l'aide d'une interface logicielle.

La seringue est reliée au support de culture par un tube silicone d'un diamètre interne de 1/16". Le support de culture peut être relié en sortie à une vanne trois voies à l'aide de ce même tube en silicone. Un réservoir placé en sortie permet de collecter le flux sortant (**Figure 41**).

Les cycles de perfusion appliqués et les solutions perfusées sont décrits dans la légende des figures correspondantes.

2.2 Culture des modèles de peau

Les modèles de peau ont été maintenus en culture dans 2 mL de milieu de culture développé par Genoskin, dans un incubateur à 37°C sous atmosphère humide et régulée à 5 % de CO₂. Le milieu de culture a été placé dans le puits et diffuse à travers la membrane de l'insert. Il a été renouvelé tous les jours.

3. Analyses histologiques

3.1 Echantillonnage des modèles de peau

A l'issue de la culture, les modèles de peau ont été coupés en deux, perpendiculairement à l'axe d'implantation du cathéter dans le cas du modèle FlowSkin, à l'aide d'un scalpel.

Une moitié a été placée en cassette histologique et fixée pendant 48 heures en formaline tamponnée à 10 % (Sigma Aldrich), à température ambiante.

Dans l'autre moitié, 6 biopsies de 2 mm de diamètre ont été produites pour l'analyse colorimétrique de la viabilité cellulaire. La disposition des biopsies a été reproduite à l'identique pour l'ensemble des expériences réalisées.

Les milieux de culture des modèles de peau ainsi que le flux sortant des modèles FlowSkin ont été congelés à -80°C.

3.2 Déshydratation, inclusion en paraffine et réalisation de coupes histologiques

Après 48 heures de fixation, les biopsies ont été transférées dans un automate de déshydratation Microm STP 120 (ThermoScientific), afin d'être progressivement déshydratées et imprégnées de paraffine par passages successifs dans différents bains d'une heure : un d'éthanol 70 % (v/v) (MM France), deux d'éthanol 95 % (v/v), trois d'éthanol 100 % (v/v), deux de xylène (VWR) et enfin deux bains d'une heure et un d'une nuit dans de la paraffine (Dominique Dutscher). Les biopsies ont ensuite été incluses en paraffine à l'aide d'une station d'enrobage EC350-1 (MM France).

Des coupes de 5 µm d'épaisseur ont été réalisées à partir de ces blocs de paraffine, à l'aide d'un microtome Microm HM340 E (MM France). Les coupes ont été déposées sur des lames polarisées (MM France).

3.3 Coloration à l'Hématoxyline et à l'Eosine

Afin d'observer la structure cellulaire et l'intégrité du tissu, une coloration bichromatique Hématoxyline et Eosine a été réalisée. L'hématoxyline est un colorant basique qui colore en bleu la chromatine présente dans le noyau des cellules. L'éosine est un colorant acide qui colore en rose les mitochondries du cytoplasme et les fibres de collagène du tissu conjonctif.

Les lames ont tout d'abord été déparaffinées dans deux bains de xylène de quatre minutes, deux bains d'éthanol 100 % (v/v) de deux minutes et un bain d'éthanol 95 % (v/v) d'une minute, puis réhydratées dans de l'eau.

Elles ont ensuite été colorées dans un bain d'Hématoxyline de Mayer (Q Path) pendant trois minutes, puis rincées à l'eau pendant trente secondes. Les lames ont été transférées dans un bain d'éthanol 95 % (v/v) supplémenté par 1 % d'acide chlorhydrique (VWR) pendant dix secondes, puis rincées une seconde fois dans de l'eau. Enfin, les lames ont été placées dans un bain d'Eosine Y alcoolique concentrée à 0,5 % (MM France) pendant deux minutes.

Pour finir, les coupes ont été déshydratées dans des bains successifs d'éthanol 100 % (v/v) et de xylène, et montées entre lame et lamelle avec le milieu de montage EuKitt® (Sigma Aldrich).

Après une heure de séchage, des images des coupes colorées ont été acquises en lumière transmise à l'aide d'un microscope DMI1 (Leica) équipé d'une caméra MC170HD (Leica).

3.4 Immunofluorescence

3.4.1. Réalisation des immunomarquages et imagerie de fluorescence

La prolifération et l'apoptose cellulaire des modèles de peau ont été étudiées par immunomarquage anti-Ki67 et anti-Caspase-3 active respectivement. Les marquages ont été réalisés sur des coupes déparaffinées selon le protocole décrit dans le paragraphe 3.3, et réhydratées en PBS.

Une étape de démasquage a tout d'abord été réalisée par incubation des lames dans un tampon à 95°C pendant 40 minutes : une solution à pH9 (DAKO) dans le cas du Ki67 et une solution de citrate à 10 mM, pH6 (MM France) dans le cas de la Caspase-3 active.

Après rinçage en PBS, une saturation a été réalisée par incubation des lames pendant 40 minutes à 37°C dans du sérum de chèvre (Dominique Dutscher) dilué au 1/20^{ème} (v/v). Dans le cas du marquage anti-Ki67, cette étape a été couplée avec une étape de perméabilisation par ajout de Triton X-100 (Euromedex) dilué à 0,5 % (v/v) dans la solution de saturation.

Après rinçage en PBS, les coupes ont été incubées dans une solution d'anticorps primaire dilué au 1/500^{ème} dans une solution de sérum de chèvre au 1/20^{ème}. L'anticorps primaire anti-Ki67 est un anticorps monoclonal de souris (M724029, DAKO). L'anticorps primaire anti-Caspase-3 active est un anticorps polyclonal de lapin (ab2302, Abcam).

Enfin, après une nuit d'incubation à 4°C, les coupes ont été rincées en PBS et incubées dans une solution d'anticorps secondaire polyclonal de chèvre (ciblant les IgG de souris ou de lapin respectivement) couplé au fluorochrome Alexa 555 (Life Technologies) et dilué au 1/2000^{ème} dans une solution de sérum de chèvre au 1/20^{ème}. L'incubation a été réalisée à température ambiante pendant une heure. Un contre-marquage nucléaire a été réalisé en diluant du 4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) (Sigma Aldrich) à 0,1 µg/mL dans la solution d'anticorps secondaire.

Après rinçage en PBS, les coupes ont été montées entre lame et lamelle dans le milieu de montage aqueux Fluoromount® (Sigma Aldrich).

Après une heure de séchage, des images de la fluorescence des échantillons ont été acquises avec un microscope (AxioImager M2, Zeiss), équipé d'une source de fluorescence LED Colibri et d'une caméra FLASH 4 LT (Hamamatsu).

3.4.2. Quantification

Les images de fluorescences obtenues ont été analysées avec le logiciel ImageJ.

Dans le cas de l'immunomarquage nucléaire anti-Ki67, le pourcentage de cellules positives dans l'épiderme a été quantifié. Pour ce faire, un seuil a tout d'abord été appliqué sur les images de la fluorescence du DAPI afin d'identifier le noyau des cellules. Un seuil a ensuite été appliqué sur les images de la fluorescence du marquage, identique pour toutes les conditions d'une même expérience, afin d'identifier le signal positif. Les régions correspondant aux noyaux des cellules ont été reportées sur les images de la fluorescence du marquage. Le nombre de noyaux colocalisant avec un signal positif a été obtenu grâce à la fonction d'analyse de particules du logiciel. Le nombre de cellules marquées a été rapporté au nombre total de noyaux dans l'épiderme, afin d'obtenir le pourcentage de cellules en prolifération dans l'épiderme.

Dans le cas de l'immunomarquage anti-Caspase-3 active, la méthode décrite précédemment ne peut être appliquée, la Caspase-3 active étant exprimée dans le cytoplasme des cellules.

Dans un premier temps, l'aire totale de l'épiderme a été mesurée grâce à l'outil polygone du logiciel. Ensuite, un seuil a été appliqué sur les images de la fluorescence du marquage, identique pour toutes les conditions d'une même expérience, afin d'identifier le signal positif. L'aire correspondant au signal positif a été mesurée, et rapportée à l'aire totale de l'épiderme.

3.5 Analyse colorimétrique de la viabilité cellulaire

Afin d'évaluer la viabilité des modèles de peau, un test colorimétrique au WST-8 a été réalisé. Ce sel de tétrazolium (2-(2-méthoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tétrazolium) forme un composé orangé soluble dans du milieu de culture lorsqu'il est réduit. Cette réduction est assurée dans les cellules vivantes, par les mitochondries qui ont une activité oxydoréductase. La densité optique de la solution est donc directement reliée à la viabilité cellulaire.

Des biopsies de 2 mm de diamètre produites dans les modèles de peau à analyser ont été immergées dans 250 µL de solution de Cell Counting Kit-8 (Sigma Aldrich) diluée au 1/10^{ème} dans du milieu de culture, et incubées à 37°C pendant 3 heures. La densité optique de la solution a été mesurée à l'aide d'un lecteur de plaques (Victor Nivo, Perkin Elmer) avec un filtre à 450 nm.

3.6 Dosage de métabolites

Afin d'évaluer la consommation de glucose et la production de lactate par les cellules, un dosage de la concentration en glucose et en lactate dans le milieu de culture des modèles de peau et dans le flux sortant des modèles FlowSkin a été réalisé.

Les kits Glucose-Glo™ et Lactate-Glo™ (Promega), ont été utilisés, en suivant le protocole proposé par le fabricant. La luminescence a été mesurée à l'aide d'un lecteur de plaques (Victor Nivo, Perkin Elmer).

3.7 Tests statistiques

Les résultats expérimentaux obtenus pour les modèles NativeSkin® contrôles et pour les modèles FlowSkin ont été comparés, pour les tests colorimétriques de viabilité, les quantifications des immunomarquages et les dosages de métabolites. Le nombre de réplicats utilisés pour les tests statistiques est précisé dans les légendes des figures correspondantes.

Afin d'analyser si les différences observées entre ces deux conditions sont significatives, des tests statistiques ont été réalisés.

Pour cela, le logiciel GraphPad Prism 8.3.0 a été utilisé. Le test de Mann-Whitney a été appliqué. Ce test est non-paramétrique, c'est-à dire qu'aucune hypothèse n'est faite quant à la distribution des variables : il peut être utilisé même si les données étudiées ne suivent pas une distribution normale. Le test de Mann-Whitney est un test de comparaison des moyennes de deux populations indépendantes, et consiste à tester l'hypothèse nulle (H_0) pour laquelle les moyennes des deux populations sont égales, en effectuant une étude de la position relative des échantillons.

La probabilité de rejeter l'hypothèse nulle si elle est vraie (p-value) a été calculée. Plus cette valeur est faible et plus la probabilité de faire une erreur en rejetant l'hypothèse H_0 est faible.

La différence entre les deux moyennes comparées a donc été considérée comme statistiquement significative pour des p-value inférieures à 0,05. Des niveaux de signification ont ainsi été établis en fonction des valeurs de p, et représentés par des étoiles sur les graphiques :

- Une étoile : $p < 0,05$
- Deux étoiles : $p < 0,01$
- Trois étoiles : $p < 0,001$

4. Analyse de la diffusion

Toutes les études de diffusion présentées dans ce projet ont été réalisées à une température de 37°C.

4.1 Evaluation macroscopique de la diffusion d'un colorant

4.1.1. Méthode

Afin d'évaluer macroscopiquement la diffusion d'un composé, un colorant alimentaire bleu (Grand Bleu, Les Artistes) a été utilisé. Ce colorant est du bleu patenté V (E131, $(C_{27}H_{31}N_2O_7S_2)Na$), d'un poids moléculaire de 1160,45 g/mol. Le colorant a été dilué à 0,5 % (poids/volume) dans du PBS.

Dans le cas d'une biopsie en flottaison, 6 mL de colorant ont été placés dans une boîte de Pétri, puis la biopsie a été déposée en flottaison. Dans le cas de la matrice, un puits de 12 mm de diamètre a été réalisé au centre d'un disque de matrice, et rempli de colorant. Dans le cas du modèle NativeSkin®, 2 mL de colorant ont été placés dans le puits de la plaque multipuits, à la place du milieu de culture. Dans le cas du modèle FlowSkin, le colorant a été perfusé dans le tissu par le biais du cathéter poreux.

Des images de la surface des modèles de peau ou de la matrice ont été prises à l'aide d'une caméra AM 4000 Series (Dino-Lite).

4.1.2. Calcul du coefficient de diffusion du colorant

a. Loi de Fick

La diffusion moléculaire décrit un mécanisme de transport de matière sous l'effet de l'agitation thermique. Pour toutes températures différentes du zéro absolu, les atomes ou molécules, quel que soit leur état d'agrégation (liquide, solide ou gaz), sont en mouvement. Le mouvement de ces particules mobiles est observable depuis des régions à forte concentration vers des régions à faible concentration, c'est à dire dès lors qu'un gradient de concentration existe.

Le phénomène de diffusion, comme tous les phénomènes de transport, suit une loi du type :

$$\text{Flux} = \text{Conductivité} \times \text{Force motrice}$$

Dans le cas de la diffusion des atomes, la conductivité est assimilée au coefficient de diffusion D , qui reflète la mobilité d'une espèce dans un environnement donné. La force motrice, quant à elle, est un gradient de concentration, c'est-à dire une variation de la concentration en fonction de la distance en x .

La première loi de Fick

La première loi de Fick est applicable aux états stationnaires et non stationnaires. Elle permet d'établir un lien entre le flux de molécules ou d'atomes et une différence de concentration dans l'espace. En considérant un flux de particule suivant un gradient de concentration suivant un axe x, nous avons :

$$J(x, t) = -D \cdot \left(\frac{dC}{dx}\right)$$

avec :

- J le flux d'espèces mobiles en mol/cm².s
- D le coefficient de diffusion en cm²/s
- C la concentration en mol/cm³
- x la distance en cm
- t le temps en s

Le flux de diffusion est négatif car il a lieu dans le sens opposé au gradient de concentration, c'est-à dire des régions à forte concentration vers les régions à faible concentration.

Comme nous l'avons mentionné précédemment, la diffusion est un mécanisme dépendant de la température. Cette dépendance se traduit par une loi de type Arrhenius :

$$D = D_0 \cdot e^{\frac{-E_a}{RT}}$$

avec :

- D₀ une constante spécifique de l'espèce
- R la constante des gaz parfaits
- E_a une énergie d'activation
- T la température

La seconde loi de Fick

La seconde loi de Fick, plus générale, est établie selon le principe de conservation de la matière. Elle permet de prendre en compte les variations temporelles de la concentration C(x,t) :

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \cdot \frac{\partial^2 C}{\partial x^2}$$

Les solutions de la seconde loi de Fick dépendent des conditions aux limites imposées en fonction du phénomène étudié. Un cas de figure assez fréquemment rencontré, est celui

de la diffusion d'un composé depuis un milieu A vers un milieu B de dimension infinie. En considérant une concentration dans le milieu A constante à l'interface et une concentration initiale homogène C_{B0} dans le milieu B, une solution de la seconde loi de Fick est donnée par l'équation suivante :

$$\frac{C_{A0} - C}{C_{A0} - C_{B0}} = \operatorname{erf} \left(\frac{x - x_0}{2 \sqrt{D \cdot t}} \right)$$

avec :

- C_{A0} la concentration initiale en composé dans la région A
- C_{B0} la concentration initiale en composé dans la région B
- D le coefficient de diffusion du composé dans le matériau B.

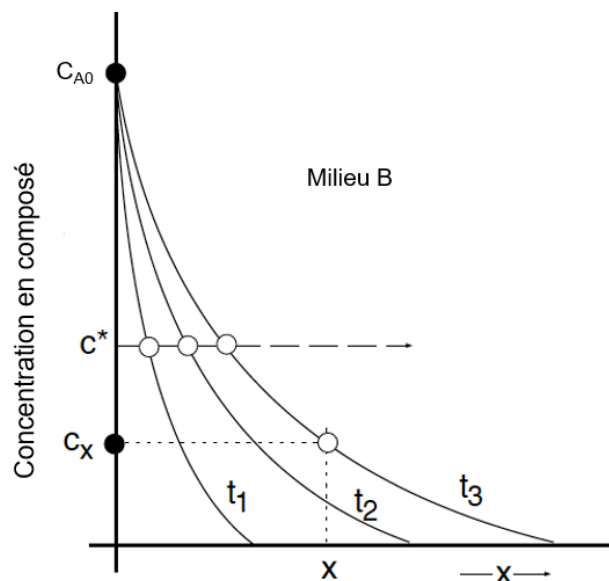


Figure 71. Progression du front de concentration c^* en fonction du temps.

b. Coefficient de diffusion du colorant dans la peau

Le coefficient de diffusion du colorant dans la peau a été calculé à partir des images acquises après une heure de diffusion. Plusieurs hypothèses ont été posées :

La peau est un milieu isotrope, la diffusion est la même dans toutes les couches de la peau,

La diffusion par la surface inférieure de la biopsie n'a pas d'impact sur la coloration de la peau observée en surface de l'explant,

La coloration observée en surface de l'explant est proportionnelle à la concentration en colorant dans toute l'épaisseur du tissu.

Les images de la surface de la peau ont été analysées à l'aide du logiciel ImageJ (**Figure 42**). Une ligne a été tracée depuis le bord de la biopsie jusqu'au centre. Les valeurs des intensités de coloration des pixels suivant cette ligne ont été extraites. Afin d'obtenir une courbe représentative de la concentration en colorant en fonction de la distance en x , la courbe obtenue précédemment a été normalisée : elle a été inversée de sorte à ce que la valeur du plateau soit égale à 0, et que la valeur initiale au point $x = 0$ devienne la valeur maximale. Ainsi, une courbe représentative de la loi de Fick a été obtenue (**Figure 42.B**), représentant le front de concentration en fonction de la distance en x .

La fonction d'erreur a été appliquée à cette courbe à l'aide du logiciel Origin (**Figure 42.C**). L'équation de la fonction erreur est la suivante :

$$y = A * \operatorname{erf} (k * (x - x_0)) + y_0$$

avec :

$$k = \frac{1}{2\sqrt{D \cdot t}}$$

d'où :

$$D = \frac{1}{4 \cdot t \cdot k^2}$$

avec :

- D le coefficient de diffusion (cm²/s)
- t le temps (s)

Ainsi, la valeur de k déterminée à l'aide du logiciel a permis de calculer le coefficient de diffusion du colorant dans la peau.

c. Coefficient de diffusion du colorant dans la matrice

La même méthode a été appliquée au calcul du coefficient de diffusion du colorant dans la matrice.

Les intensités de coloration ont été mesurées suivant un axe partant du bord du puits contenant le colorant jusqu'au bord de la boîte de Pétri.

4.2 Radiographie et tomographie à rayons X

Afin d'évaluer la diffusion d'un composé en temps réel sur toute l'épaisseur du tissu, et en 3D, des radiographies et des tomographies à rayons X ont été réalisées.

Pour cela, une machine de microtomographie à rayons X EasyTom (RX Solutions) installée à l'Institut de Mécaniques des Fluides de Toulouse a été utilisée, en collaboration avec Paul Duru. Cette machine est équipée d'une source de rayons X microfocus de 150 kV (Hamamatsu).

Les radiographies à rayons X ont été réalisées à une puissance de faisceau de 14 W, correspondant à une tension d'accélération de 65 kV et une intensité de 220 µA. Le temps d'exposition a été réglé à 0,15 s. Avant l'acquisition, un étalonnage du noir et du gain a été effectué.

Les tomographies à rayons X ont été obtenues en réalisant 1440 acquisitions des échantillons à différents angles également répartis sur 360°. Le volume 3D a été reconstruit grâce au logiciel RX Solution Software (X-Act).

Un agent de contraste, de l'iodure de potassium (KI) d'un poids moléculaire de 166 g/mol a été utilisé comme solution de perfusion des modèles, dilué à 0,5 g/mL dans du PBS.

Le post-traitement des images 3D a été réalisé grâce au logiciel Imaris. Un seuil a été appliqué afin de segmenter la zone de diffusion de l'agent de contraste. Ce seuil a été choisi de façon arbitraire, afin de représenter au mieux le volume de diffusion observé, et en cohérence avec le profil de diffusion observé en surface sur les expériences de perfusion de colorant bleu à des temps similaires.

4.3 Evaluation de la diffusion de dextrans fluorescents

4.3.1. Méthode

Afin d'évaluer la diffusion de composés de différents poids moléculaires dans les modèles de peau, deux dextrans ont été utilisés :

Un dextran de 10 kDa couplé au fluorophore Alexa Fluor 647 (Invitrogen),

Un dextran de 70 kDa couplé au Fluorophore Texas Red (Invitrogen).

Ces dextrans ont été utilisés à une concentration de 0,08 mg/mL dans du PBS, en substitut du milieu de culture pour une biopsie en flottaison ou pour le modèle NativeSkin®, ou perfusés via le dispositif microporeux pour le modèle FlowSkin.

A la fin de la culture, les modèles ont été coupés en deux, perpendiculairement à l'axe d'implantation du cathéter pour le modèle FlowSkin. Deux cas de figure se sont ensuite présentés.

Les biopsies ont soit été fixées en formaline tamponnée à 10 % pendant 48 heures à température ambiante, puis déshydratées, incluses en paraffine et coupées à une épaisseur de 5 µm, comme décrit dans le paragraphe 3.2. Le xylène a cependant été remplacé par du cyclohexane afin de préserver la fluorescence des échantillons.

Sinon, les biopsies ont pu être incluses en OCT (Optimal Cutting Temperature compound) (Cell Path) et congelées à -80°C. Des coupes cryologiques de 5 µm d'épaisseur ont ensuite été réalisées à l'aide d'un cryostat CM 1950 (Leica).

4.3.2. Imagerie de fluorescence

Que ce soit pour les coupes paraffine ou pour les coupes cryologiques, un contre-marquage nucléaire a été réalisé en diluant du 4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) à 0,1 µg/mL dans le milieu de montage aqueux Fluoromount® utilisé pour le montage entre lame et lamelle. Dans le cas des coupes paraffines, les lames ont préalablement été déparaffinées et réhydratées en PBS tel que décrit dans le paragraphe 3.3. Les coupes cryologiques ont simplement été réhydratées en PBS.

Après une heure de séchage, des images de la fluorescence des échantillons ont été acquises avec un microscope (AxioImager M2, Zeiss), équipée d'une source de fluorescence LED Colibri et d'une caméra FLASH 4 LT (Hamamatsu).

4.3.3. Calculs de coefficients de diffusion

Les images de fluorescence obtenues ont été analysées avec le logiciel Zen 3.1.

Tout d'abord, un seuil a été appliqué sur les images de la fluorescence du DAPI afin d'identifier le noyau des cellules, et ainsi permettre de repérer la position de l'épiderme dans la coupe. Un seuil a ensuite été appliqué sur les images de la fluorescence du dextran, identique pour toutes les conditions d'une même expérience, afin d'identifier le signal positif.

Les tangentes aux côtés des biopsies ont été tracées, afin de définir les bords de la biopsie. Un rectangle a alors été défini depuis le bord en direction du centre de la biopsie sur une largeur d'environ 3 mm, et sur une hauteur d'environ 2 mm afin de ne pas prendre en compte la surface inférieure de la biopsie au niveau de laquelle le flux de dextran a une incidence sur l'intensité du signal (**Figure 47**).

La moyenne des intensités du signal des pixels situés à une valeur x fixe, sur toute la hauteur y de ce rectangle a été calculée, pour toutes les valeurs x du rectangle. La courbe ainsi obtenue a été normalisée tel que décrit dans le paragraphe 4.1.2.b, afin d'obtenir une courbe de la concentration en dextran en fonction de la distance en x , représentative de la loi de Fick mentionnée ci-dessus.

Les coefficients de diffusion ont été calculés comme décrit dans le paragraphe 4.1.2.b.

5. Simulation numérique de la diffusion

Le modèle numérique de diffusion d'un composé dans un explant de peau a été développé grâce à la version 5.5 du logiciel COMSOL dotée des modules « Transport moléculaire dans des milieux dilués » et « Ecoulements laminaires ». La diffusion a été simulée sur 24 heures.

5.1 Hypothèses

Afin de faciliter la modélisation, différentes hypothèses ont dues être posées :

- L'épaisseur de la biopsie a été fixée à 3 mm. Les variations d'épaisseur du tissu observées entre les donneurs n'ont pas été prises en compte.
- La peau a été considérée comme un matériau isotrope, avec un coefficient de diffusion unique pour chaque composé dans le tissu, sans prendre en compte les différences en termes de diffusion entre les différentes couches (derme et épiderme).
- La hauteur de matrice simulée correspond à la hauteur correspondant au volume de matrice présent dans l'insert, sans prendre en compte le déplacement de matière dû à l'ajout de la biopsie en flottaison.
- Des concentrations arbitraires ont été fixées à l'état initial : une concentration de 1 a été attribuée au milieu de culture et au fluide perfusé, lorsque le composé est présent, et une concentration de 0,4 a été attribuée à la matrice lorsqu'elle contient le composé d'intérêt. Le ratio de concentration entre le milieu de culture et la matrice est le même que le ratio appliqué réellement lors de la dilution du milieu de culture dans la matrice.

5.2 Reproduction de la géométrie des modèles

Dans un premier temps, la géométrie des modèles a été reproduite sur le logiciel par CAO (Conception Assistée par Ordinateur). Les différents compartiments composant les modèles - le milieu de culture, la matrice, la biopsie et le cathéter – ont été générés par imbrication de cylindres, en respectant les dimensions réelles.

5.3 Application de la loi de Fick

Afin de simuler les phénomènes de transport de matière ayant lieu dans les explants de peau, les modules « Transport moléculaire dans des milieux dilués » et « Ecoulements laminaires » ont été utilisés.

Pour chaque compartiment, un coefficient de diffusion a été appliqué. Les coefficients de diffusion utilisés sont les coefficients de diffusion déterminés expérimentalement pour le colorant, à savoir $9,3 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$ pour le coefficient de diffusion du colorant dans la peau et $1,4 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$ pour le coefficient de diffusion du colorant dans la matrice. Les hypothèses posées pour la détermination de ces coefficients ont donc également été considérées comme vraies pour la modélisation. En ce qui concerne le milieu de culture, un coefficient de diffusion de $2 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$ a été appliqué : en effet, il est communément admis que les espèces de faible poids moléculaire en solution ont une diffusivité comprise entre $1 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$ et $2 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$.

Une concentration initiale a également été définie pour chaque compartiment, en fonction de l'application souhaitée. Les concentrations initiales fixées sont décrites dans la légende des figures correspondantes.

Les flux de matière à simuler ont ensuite été définis pour chaque condition.

En ce qui concerne la modélisation de FlowSkin, un cylindre d'une longueur de 10 mm, correspondant à la zone poreuse du cathéter, a été défini au centre de la biopsie, à une profondeur de 1 mm sous l'épiderme. La concentration dans ce cylindre a été définie égale à 1 U.A, et considérée comme constante au cours du temps, la solution perfusée étant sans cesse renouvelée lors de la perfusion.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abaci, H.E., Gledhill, K., Guo, Z., Christiano, A.M., Shuler, M.L., 2015. Pumpless microfluidic platform for drug testing on human skin equivalents. *Lab. Chip* 15, 882–888. <https://doi.org/10.1039/C4LC00999A>
- Abd, E., Yousuf, S., Pastore, M., Telaprolu, K., Mohammed, Y., Namjoshi, S., Grice, J., Roberts, M., 2016. Skin models for the testing of transdermal drugs. *Clin. Pharmacol. Adv. Appl.* Volume 8, 163–176. <https://doi.org/10.2147/CPAA.S64788>
- Abdallah, F., Mijouin, L., Pichon, C., 2017. Skin Immune Landscape: Inside and Outside the Organism. *Mediators Inflamm.* 2017, 1–17. <https://doi.org/10.1155/2017/5095293>
- Alkilani, A.Z., McCrudden, M.T.C., Donnelly, R.F., 2015. Transdermal Drug Delivery: Innovative Pharmaceutical Developments Based on Disruption of the Barrier Properties of the stratum corneum. *Pharmaceutics* 7, 438–470. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics7040438>
- Astolfi, M., Péant, B., Lateef, M.A., Rousset, N., Kendall-Dupont, J., Carmona, E., Monet, F., Saad, F., Provencher, D., Mes-Masson, A.-M., Gervais, T., 2016. Micro-dissected tumor tissues on chip: an ex vivo method for drug testing and personalized therapy. *Lab. Chip* 16, 312–325. <https://doi.org/10.1039/C5LC01108F>
- Ataç, B., Wagner, I., Horland, R., Lauster, R., Marx, U., Tonevitsky, A.G., Azar, R.P., Lindner, G., 2013. Skin and hair on-a-chip: in vitro skin models versus ex vivo tissue maintenance with dynamic perfusion. *Lab. Chip* 13, 3555. <https://doi.org/10.1039/c3lc50227a>
- Auger, F.A., Gibot, L., Lacroix, D., 2013. The Pivotal Role of Vascularization in Tissue Engineering. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 15, 177–200. <https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-071812-152428>
- Augustine, R., 2018. Skin bioprinting: a novel approach for creating artificial skin from synthetic and natural building blocks. *Prog. Biomater.* 7, 77–92. <https://doi.org/10.1007/s40204-018-0087-0>
- Bain, B.J., 2017. Structure and function of red and white blood cells. *Medicine (Baltimore)* 45, 187–193. <https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2017.01.011>
- Barlow, A.D., Hamed, M.O., Mallon, D.H., Brais, R.J., Gribble, F.M., Scott, M.A., Howat, W.J., Bradley, J.A., Bolton, E.M., Pettigrew, G.J., Hosgood, S.A., Nicholson, M.L., Saeb-Parsy, K., 2015. Use of Ex Vivo Normothermic Perfusion for Quality Assessment of Discarded Human Donor Pancreases: EVNP of Discarded Human Pancreases. *Am. J. Transplant.* 15, 2475–2482. <https://doi.org/10.1111/ajt.13303>
- Bernerd, F., 2005. La peau reconstruite : modèle d'étude du keratinocyte, du fibroblaste et de leurs interactions. Effets des ultraviolets, dommages et réparation. *J. Société Biol.* 199, 313–320. <https://doi.org/10.1051/jbio:2005032>
- Bidmon, H.J., Pitts, J.D., Solomon, H.F., Bondi, J.V., Stumpf, W.E., 1990. Estradiol distribution and penetration in rat skin after topical application, studied by high resolution autoradiography. *Histochemistry* 95, 43–54. <https://doi.org/10.1007/BF00737227>

- Black, A.F., Berthod, F., L'Heureux, N., Germain, L., Auger, F.A., 1998. In vitro reconstruction of a human capillary-like network in a tissue-engineered skin equivalent. *FASEB J.* 12, 1331–1340. <https://doi.org/10.1096/fasebj.12.13.1331>
- Bodenlenz, M., Tiffner, K.I., Raml, R., Augustin, T., Dragatin, C., Birngruber, T., Schimek, D., Schwagerle, G., Pieber, T.R., Raney, S.G., Kanfer, I., Sinner, F., 2017. Open Flow Microperfusion as a Dermal Pharmacokinetic Approach to Evaluate Topical Bioequivalence. *Clin. Pharmacokinet.* 56, 91–98. <https://doi.org/10.1007/s40262-016-0442-z>
- Boettcher, W., Merkle, F., Weitkemper, H.-H., 2003a. History of extracorporeal circulation: the conceptional and developmental period. *J. Extra. Corpor. Technol.* 35, 172–183.
- Boettcher, W., Merkle, F., Weitkemper, H.-H., 2003b. History of extracorporeal circulation: the invention and modification of blood pumps. *J. Extra. Corpor. Technol.* 35, 184–191.
- Bonnel, D., Legouffe, R., Eriksson, A.H., Mortensen, R.W., Pamelard, F., Stauber, J., Nielsen, K.T., 2018. MALDI imaging facilitates new topical drug development process by determining quantitative skin distribution profiles. *Anal. Bioanal. Chem.* 410, 2815–2828. <https://doi.org/10.1007/s00216-018-0964-3>
- Braverman, I.M., 2000. The cutaneous microcirculation. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.* 5, 3–9. <https://doi.org/10.1046/j.1087-0024.2000.00010.x>
- Bunch, J., Clench, M.R., Richards, D.S., 2004. Determination of pharmaceutical compounds in skin by imaging matrix-assisted laser desorption/ionisation mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 18, 3051–3060. <https://doi.org/10.1002/rcm.1725>
- Calapre, L., Gray, E.S., Kurdykowski, S., David, A., Hart, P., Descargues, P., Ziman, M., 2016. Heat-mediated reduction of apoptosis in UVB-damaged keratinocytes in vitro and in human skin ex vivo. *BMC Dermatol.* 16. <https://doi.org/10.1186/s12895-016-0043-4>
- Callaghan, J.C., 1986. Extracorporeal Circulation, in: Wu, Y., Peters, R.M. (Eds.), *International Practice in Cardiothoracic Surgery*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 110–120. https://doi.org/10.1007/978-94-009-4259-2_12
- Camargo, C.P., Gemperli, R., 2018. Endothelial Function in Skin Microcirculation, in: *Endothelium and Cardiovascular Diseases*. Elsevier, pp. 673–679. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812348-5.00047-7>
- Candi, E., Schmidt, R., Melino, G., 2005. The cornified envelope: a model of cell death in the skin. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 328–340. <https://doi.org/10.1038/nrm1619>
- Charkoudian, N., 2003. Skin blood flow in adult human thermoregulation: how it works, when it does not, and why. *Mayo Clin. Proc.* 78, 603–612. <https://doi.org/10.4065/78.5.603>
- Chassot, P.-G., Bettex, D., Boegli, Y., Delabays, A., Ferrarri, E., Iglesias, J.-F., Marcucci, C., Ruchat, P., Spahn, D., Thorin, D., 2010. *Précis d'Anesthésie Cardiaque*.

- Cornelissen, L.H., Bronneberg, D., Oomens, C.W.J., Baaijens, F.P.T., 2008. Diffusion measurements in epidermal tissues with fluorescent recovery after photobleaching. *Skin Res. Technol.* 14, 462–467. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0846.2008.00313.x>
- Crickx, B., 2005. Comprendre la peau. *Ann. Dermatol. Vénéréologie* 132, 3. [https://doi.org/10.1016/S0151-9638\(05\)79529-6](https://doi.org/10.1016/S0151-9638(05)79529-6)
- Cypel, M., Neyrinck, A., Machuca, T.N., 2019. Ex vivo perfusion techniques: state of the art and potential applications. *Intensive Care Med.* 45, 354–356. <https://doi.org/10.1007/s00134-019-05568-3>
- Dawson, A., Dyer, C., Macfie, J., Davies, J., Karsai, L., Greenman, J., Jacobsen, M., 2016. A microfluidic chip based model for the study of full thickness human intestinal tissue using dual flow. *Biomicrofluidics* 10, 064101. <https://doi.org/10.1063/1.4964813>
- De Wever, B., Kurdykowski, S., Descargues, P., 2015. Human Skin Models for Research Applications in Pharmacology and Toxicology: Introducing NativeSkin[®], the “Missing Link” Bridging Cell Culture and/or Reconstructed Skin Models and Human Clinical Testing. *Appl. Vitro Toxicol.* 1, 26–32. <https://doi.org/10.1089/aivt.2014.0010>
- Dodson, K.H., Echevarria, F.D., Li, D., Sappington, R.M., Edd, J.F., 2015. Retina-on-a-chip: a microfluidic platform for point access signaling studies. *Biomed. Microdevices* 17, 114. <https://doi.org/10.1007/s10544-015-0019-x>
- Dragatin, C., Polus, F., Bodenlenz, M., Calonder, C., Aigner, B., Tiffner, K.I., Mader, J.K., Ratzner, M., Woessner, R., Pieber, T.R., Cheng, Y., Loesche, C., Sinner, F., Bruin, G., 2016. Secukinumab distributes into dermal interstitial fluid of psoriasis patients as demonstrated by open flow microperfusion. *Exp. Dermatol.* 25, 157–159. <https://doi.org/10.1111/exd.12863>
- Duracher, L., Visdal-Johnsen, L., Mavon, A., Kurdykowski, S., Descargues, P., 2015. A Novel Explant Model for Skin Delivery Assessment. *Cosmet. Toilet.* 130, 30.
- Freinkel, D.R.K., Woodley, D.T., 2001. *The Biology of the Skin*. CRC Press.
- Frueh, F.S., Menger, M.D., Lindenblatt, N., Giovanoli, P., Laschke, M.W., 2017. Current and emerging vascularization strategies in skin tissue engineering. *Crit. Rev. Biotechnol.* 37, 613–625. <https://doi.org/10.1080/07388551.2016.1209157>
- García Sáez, D., Zych, B., Sabashnikov, A., Bowles, C.T., De Robertis, F., Mohite, P.N., Popov, A.-F., Maunz, O., Patil, N.P., Weymann, A., Pitt, T., McBrearty, L., Pates, B., Hards, R., Amrani, M., Bahrami, T., Banner, N.R., Simon, A.R., 2014. Evaluation of the Organ Care System in Heart Transplantation With an Adverse Donor/Recipient Profile. *Ann. Thorac. Surg.* 98, 2099–2106. <https://doi.org/10.1016/j.athoracsur.2014.06.098>
- Geeraerts, T., Duranteau, J., Vigue, B., 2008. Microdialyse cérébrale : méthodologie et applications cliniques. *Réanimation* 17, 702–707. <https://doi.org/10.1016/j.reaurg.2008.07.003>
- Glöggl, S., Rizzitelli, S., Pinaud, N., Raffard, G., Zhendre, V., Bouchaud, V., Sanchez, S., Radecki, G., Ciobanu, L., Wong, A., Crémillieux, Y., 2016. In vivo online

- magnetic resonance quantification of absolute metabolite concentrations in microdialysate. *Sci. Rep.* 6, 36080. <https://doi.org/10.1038/srep36080>
- Gordon-Smith, T., 2013. Structure and function of red and white blood cells. *Medicine (Baltimore)* 41, 193–199. <https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2013.01.023>
- Grégoire, S., Luengo, G.S., Hallegot, P., Pena, A.-M., Chen, X., Bornschlögl, T., Chan, K.F., Pence, I., Obeidy, P., Feizpour, A., Jeong, S., Evans, C.L., 2019. Imaging and quantifying drug delivery in skin – Part 1: Autoradiography and mass spectrometry imaging. *Adv. Drug Deliv. Rev.* S0169409X19302078. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2019.11.004>
- Halldorsson, S., Lucumi, E., Gómez-Sjöberg, R., Fleming, R.M.T., 2015. Advantages and challenges of microfluidic cell culture in polydimethylsiloxane devices. *Biosens. Bioelectron.* 63, 218–231. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.07.029>
- Hammarlund-Udenaes, M., 2017. Microdialysis as an Important Technique in Systems Pharmacology—a Historical and Methodological Review. *AAPS J.* 19, 1294–1303. <https://doi.org/10.1208/s12248-017-0108-2>
- Harrison, C.A., Dalley, A.J., Mac Neil, S., 2005. A simple in vitro model for investigating epithelial/mesenchymal interactions: keratinocyte inhibition of fibroblast proliferation and fibronectin synthesis. *Wound Repair Regen.* 13, 543–550. <https://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2005.00076.x>
- Hasan, A., Paul, A., Vrana, N.E., Zhao, X., Memic, A., Hwang, Y.-S., Dokmeci, M.R., Khademhosseini, A., 2014. Microfluidic techniques for development of 3D vascularized tissue. *Biomaterials* 35, 7308–7325. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.04.091>
- Hersini, K., Melgaard, L., Gazerani, P., Petersen, L., 2014. Microdialysis of Inflammatory Mediators in the Skin: A Review. *Acta Derm. Venereol.* 94, 501–511. <https://doi.org/10.2340/00015555-1878>
- Holmgaard, R., Benfeldt, E., Nielsen, J.B., Gatschelhofer, C., Sorensen, J.A., Höfferer, C., Bodenlenz, M., Pieber, T.R., Sinner, F., 2012. Comparison of Open-Flow Microperfusion and Microdialysis Methodologies When Sampling Topically Applied Fentanyl and Benzoic Acid in Human Dermis Ex Vivo. *Pharm. Res.* 29, 1808–1820. <https://doi.org/10.1007/s11095-012-0705-9>
- Hunt, D.W., Winters, G.C., Brownsey, R.W., Kulpa, J.E., Gilliland, K.L., Thiboutot, D.M., Hofland, H.E., 2017. Inhibition of Sebum Production with the Acetyl Coenzyme A Carboxylase Inhibitor Olumacostat Glasaretil. *J. Invest. Dermatol.* 137, 1415–1423. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2016.12.031>
- Hussain, S.H., Limthongkul, B., Humphreys, T.R., 2013. The Biomechanical Properties of the Skin. *Dermatol. Surg.* 39, 193–203. <https://doi.org/10.1111/dsu.12095>
- Ishack, S., Lipner, S.R., 2020. A Review of 3-Dimensional Skin Bioprinting Techniques: Applications, Approaches, and Trends. *Dermatol. Surg.* Publish Ahead of Print. <https://doi.org/10.1097/DSS.0000000000002378>

- Jadhav, S.B., Khaowroongrueng, V., Derendorf, H., 2016. Microdialysis of Large Molecules. *J. Pharm. Sci.* 105, 3233–3242. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2016.08.016>
- Jardet, C., Anthony, D., Emilie, B., Pascal, D., Jean-Louis, G., Josephine, H., Hanne, N., Paola, L., 2020. Development and characterization of a human Th17-driven *ex vivo* skin inflammation model. *Exp. Dermatol.* exd.14160. <https://doi.org/10.1111/exd.14160>
- Jing, L., Yao, L., Zhao, M., Peng, L., Liu, M., 2018. Organ preservation: from the past to the future. *Acta Pharmacol. Sin.* 39, 845–857. <https://doi.org/10.1038/aps.2017.182>
- Kanitakis, J., 2002. Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. *Eur. J. Dermatol.* EJD 12, 390–399; quiz 400–401.
- Kasil, A., Giraud, S., Couturier, P., Amiri, A., Danion, J., Donatini, G., Matillon, X., Hauet, T., Badet, L., 2019. Individual and Combined Impact of Oxygen and Oxygen Transporter Supplementation during Kidney Machine Preservation in a Porcine Preclinical Kidney Transplantation Model. *Int. J. Mol. Sci.* 20, 1992. <https://doi.org/10.3390/ijms20081992>
- Kellogg, D.L., 2010. Thermoregulatory and thermal control in the human cutaneous circulation. *Front. Biosci.* S2, 825–853. <https://doi.org/10.2741/s105>
- Kim, U.R., Peterfreund, R.A., Lovich, M.A., 2017. Drug Infusion Systems: Technologies, Performance, and Pitfalls. *Anesth. Analg.* 124, 1493–1505. <https://doi.org/10.1213/ANE.0000000000001707>
- Kolbinger, F., Loesche, C., Valentin, M.-A., Jiang, X., Cheng, Y., Jarvis, P., Peters, T., Calonder, C., Bruin, G., Polus, F., Aigner, B., Lee, D.M., Bodenlenz, M., Sinner, F., Pieber, T.R., Patel, D.D., 2017. β -Defensin 2 is a responsive biomarker of IL-17A-driven skin pathology in patients with psoriasis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 139, 923–932.e8. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.06.038>
- Lanao, J., Fraile, M., 2005. Drug Tissue Distribution: Study Methods and Therapeutic Implications. *Curr. Pharm. Des.* 11, 3829–3845. <https://doi.org/10.2174/138161205774580679>
- LaRocco, B.G., Wang, H.E., 2003. Intraosseous Infusion. *Prehosp. Emerg. Care* 7, 280–285. <https://doi.org/10.1080/10903120390936950>
- Lazzari, G., 2019. The Most Used Microfabrication Techniques in Microfluidics [WWW Document]. *Darwin Microfluid.* URL <https://darwin-microfluidics.com/blogs/reviews/the-most-used-microfabrication-techniques-in-microfluidics> (accessed 8.5.19).
- Lebonvallet, N., Jeanmaire, C., Danoux, L., Sibille, P., Pauly, G., Misery, L., 2010. The evolution and use of skin explants: potential and limitations for dermatological research. *Eur. J. Dermatol.* EJD 20, 671–684. <https://doi.org/10.1684/ejd.2010.1054>

- Lee, K.Y., Mooney, D.J., 2001. Hydrogels for Tissue Engineering. *Chem. Rev.* 101, 1869–1880. <https://doi.org/10.1021/cr000108x>
- Lei, T.C., Virador, V.M., Vieira, W.D., Hearing, V.J., 2002. A Melanocyte–Keratinocyte Coculture Model to Assess Regulators of Pigmentation in Vitro. *Anal. Biochem.* 305, 260–268. <https://doi.org/10.1006/abio.2002.5665>
- Li, M., Moeen Rezakhanlou, A., Chavez-Munoz, C., Lai, A., Ghahary, A., 2009. Keratinocyte-releasable factors increased the expression of MMP1 and MMP3 in co-cultured fibroblasts under both 2D and 3D culture conditions. *Mol. Cell. Biochem.* 332, 1–8. <https://doi.org/10.1007/s11010-009-0167-5>
- Lovett, M., Lee, K., Edwards, A., Kaplan, D.L., 2009. Vascularization strategies for tissue engineering. *Tissue Eng. Part B Rev.* 15, 353–370. <https://doi.org/10.1089/ten.TEB.2009.0085>
- Masters, J.R., Stacey, G.N., 2007. Changing medium and passaging cell lines. *Nat. Protoc.* 2, 2276–2284. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.319>
- Mathes, S.H., Ruffner, H., Graf-Hausner, U., 2014. The use of skin models in drug development. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 69–70, 81–102. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2013.12.006>
- Matsui, T., Amagai, M., 2015. Dissecting the formation, structure and barrier function of the stratum corneum. *Int. Immunol.* 27, 269–280. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxv013>
- Mazumdar, J., 2015. *Biofluid Mechanics (second Edition)*. World Scientific.
- McLean, I.C., Schwerdtfeger, L.A., Tobet, S.A., Henry, C.S., 2018. Powering ex vivo tissue models in microfluidic systems. *Lab. Chip* 18, 1399–1410. <https://doi.org/10.1039/C8LC00241J>
- Melgaard, L., Hersini, K.J., Gazerani, P., Petersen, L.J., 2013. Retrodialysis: A Review of Experimental and Clinical Applications of Reverse Microdialysis in the Skin. *Skin Pharmacol. Physiol.* 26, 160–174. <https://doi.org/10.1159/000351341>
- Mori, N., Morimoto, Y., Takeuchi, S., 2017. Skin integrated with perfusable vascular channels on a chip. *Biomaterials* 116, 48–56. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.11.031>
- Muller, Q., Beaudet, M.-J., De Serres-Bérard, T., Bellenfant, S., Flacher, V., Berthod, F., 2018. Development of an innervated tissue-engineered skin with human sensory neurons and Schwann cells differentiated from iPS cells. *Acta Biomater.* 82, 93–101. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.10.011>
- Munshi, L., Keshavjee, S., Cypel, M., 2013. Donor management and lung preservation for lung transplantation. *Lancet Respir. Med.* 1, 318–328. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(12\)70064-4](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(12)70064-4)
- Narayan, R.R., Pancer, N.E., Loeb, B.W., Oki, K., Crouch, A., Backus, S., Chauhan, Y., Patron-Lozano, R., Rodriguez-Davalos, M.I., Geibel, J.P., Fan, R.E., Zinter, J.P., 2014. A novel device to preserve intestinal tissue Ex-Vivo by cold peristaltic perfusion. *IEEE*, pp. 3118–3121. <https://doi.org/10.1109/EMBC.2014.6944283>

- Narda, M., Brown, A., Muscatelli-Groux, B., Grimaud, J.A., Granger, C., 2020. Epidermal and Dermal Hallmarks of Photoaging are Prevented by Treatment with Night Serum Containing Melatonin, Bakuchiol, and Ascorbyl Tetraisopalmitate: In Vitro and Ex Vivo Studies. *Dermatol. Ther.* 10, 191–202. <https://doi.org/10.1007/s13555-019-00349-8>
- Nguyen, H.X., Puri, A., Bhattacharjee, S.A., Banga, A.K., 2018. Qualitative and quantitative analysis of lateral diffusion of drugs in human skin. *Int. J. Pharm.* 544, 62–74. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.04.013>
- Nishidate, M., Hayashi, M., Aikawa, H., Tanaka, K., Nakada, N., Miura, S.-I., Ryu, S., Higashi, T., Ikarashi, Y., Fujiwara, Y., Hamada, A., 2019. Applications of MALDI mass spectrometry imaging for pharmacokinetic studies during drug development. *Drug Metab. Pharmacokinet.* 34, 209–216. <https://doi.org/10.1016/j.dmpk.2019.04.006>
- Nishimura, M., Hayashi, M., Mizutani, Y., Takenaka, K., Imamura, Y., Chayahara, N., Toyoda, M., Kiyota, N., Mukohara, T., Aikawa, H., Fujiwara, Y., Hamada, A., Minami, H., 2018. Distribution of erlotinib in rash and normal skin in cancer patients receiving erlotinib visualized by matrix assisted laser desorption/ionization mass spectrometry imaging. *Oncotarget* 9, 18540–18547. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.24928>
- Njoku, M., Peter, D.S., Mackenzie, C.F., 2015. Haemoglobin-based oxygen carriers: indications and future applications. *Br. J. Hosp. Med.* 76, 78–83. <https://doi.org/10.12968/hmed.2015.76.2.78>
- Norsgaard, H., Kurdykowski, S., Descargues, P., Gonzalez, T., Marstrand, T., Dünstl, G., Røpke, M., 2014. Calcipotriol counteracts betamethasone-induced decrease in extracellular matrix components related to skin atrophy. *Arch. Dermatol. Res.* 306, 719–729. <https://doi.org/10.1007/s00403-014-1485-3>
- Novosel, E.C., Kleinhans, C., Kluger, P.J., 2011. Vascularization is the key challenge in tissue engineering. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 63, 300–311. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2011.03.004>
- Oh, J.W., Hsi, T.-C., Guerrero-Juarez, C.F., Ramos, R., Plikus, M.V., 2013. Organotypic Skin Culture. *J. Invest. Dermatol.* 133, 1–4. <https://doi.org/10.1038/jid.2013.387>
- Olszewski, W.L., 2003. The Lymphatic System in Body Homeostasis: Physiological Conditions. *Lymphat. Res. Biol.* 1, 11–24. <https://doi.org/10.1089/15396850360495655>
- OpenStax, 2013. 20.3 Capillary Exchange, in: *Anatomy and Physiology*. OpenStax.
- Pena, A.-M., Chen, X., Pence, I.J., Bornschlögl, T., Jeong, S., Grégoire, S., Luengo, G.S., Hallegot, P., Obeidy, P., Feizpour, A., Chan, K.F., Evans, C.L., 2020. Imaging and quantifying drug delivery in skin – Part 2: Fluorescence and vibrational spectroscopic imaging methods. *Adv. Drug Deliv. Rev.* S0169409X20300156. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2020.03.003>

- Perry, W.J., Patterson, N.H., Prentice, B.M., Neumann, E.K., Caprioli, R.M., Spraggins, J.M., 2020. Uncovering matrix effects on lipid analyses in MALDI imaging mass spectrometry experiments. *J. Mass Spectrom.* 55, e4491. <https://doi.org/10.1002/jms.4491>
- Peterfreund, R.A., Philip, J.H., 2013. Critical parameters in drug delivery by intravenous infusion. *Expert Opin. Drug Deliv.* 10, 1095–1108. <https://doi.org/10.1517/17425247.2013.785519>
- Pirenne, J., 2010. Time to think out of the (ice) box. *Curr. Opin. Organ Transplant.* 15, 147–149. <https://doi.org/10.1097/MOT.0b013e328336959f>
- Prausnitz, M.R., Langer, R., 2008. Transdermal drug delivery. *Nat. Biotechnol.* 26, 1261–1268. <https://doi.org/10.1038/nbt.1504>
- Prideaux, B., Stoeckli, M., 2012. Mass spectrometry imaging for drug distribution studies. *J. Proteomics* 75, 4999–5013. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2012.07.028>
- Prodanov, L., Jindal, R., Bale, S.S., Hegde, M., McCarty, W.J., Golberg, I., Bhushan, A., Yarmush, M.L., Usta, O.B., 2016. Long-term maintenance of a microfluidic 3D human liver sinusoid: Maintenance of a Microfluidic 3D Human Liver Sinusoid. *Biotechnol. Bioeng.* 113, 241–246. <https://doi.org/10.1002/bit.25700>
- Prost-Squarcioni, C., 2006. Histologie de la peau et des follicules pileux. *médecine/sciences* 22, 131–137. <https://doi.org/10.1051/medsci/2006222131>
- Ramirez Molina, C., Falkencrone, S., Skov, P.S., Hooper-Greenhill, E., Barker, M., Dickson, M.C., 2019. GSK2646264, a spleen tyrosine kinase inhibitor, attenuates the release of histamine in ex vivo human skin. *Br. J. Pharmacol.* 176, 1135–1142. <https://doi.org/10.1111/bph.14610>
- Rea, H., Kirby, B., 2019. A Review of Cutaneous Microdialysis of Inflammatory Dermatoses. *Acta Derm. Venereol.* 99, 945–952. <https://doi.org/10.2340/00015555-3223>
- Riviere, J.E., Bowman, K.F., Monteiro-Riviere, N.A., Dix, L.P., Carver, M.P., 1986. The Isolated Perfused Porcine Skin Flap (IPPSF): I. A Novel in Vitro Model for Percutaneous Absorption and Cutaneous Toxicology Studies. *Toxicol. Sci.* 7, 444–453. <https://doi.org/10.1093/toxsci/7.3.444>
- Rodrigues Neves, C., Gibbs, S., 2018. Progress on Reconstructed Human Skin Models for Allergy Research and Identifying Contact Sensitizers. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/82_2018_88
- Römgens, A.M., Bader, D.L., Bouwstra, J.A., Baaijens, F.P.T., Oomens, C.W.J., 2015. Diffusion profile of macromolecules within and between human skin layers for (trans)dermal drug delivery. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 50, 215–222. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2015.06.019>
- Ronquist, G., Andersson, A., Bendsoe, N., Falck, B., 2003. Human epidermal energy metabolism is functionally anaerobic. *Exp. Dermatol.* 12, 572–579. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0625.2003.00018.x>

- Rouwkema, J., Rivron, N.C., van Blitterswijk, C.A., 2008. Vascularization in tissue engineering. *Trends Biotechnol.* 26, 434–441. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2008.04.009>
- Rutherford, T., Black, J.G., 1969. The use of autoradiography to study the localization of germicides in skin. *Br. J. Dermatol.* 81, 75–87. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.1969.tb16066.x>
- Sahota, P.S., Burn, J.L., Heaton, M., Freedlander, E., Suvarna, S.K., Brown, N.J., Mac Neil, S., 2003. Development of a reconstructed human skin model for angiogenesis. *Wound Repair Regen.* 11, 275–284. <https://doi.org/10.1046/j.1524-475X.2003.11407.x>
- Santambrogio, L., 2018. The Lymphatic Fluid, in: *International Review of Cell and Molecular Biology.* Elsevier, pp. 111–133. <https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2017.12.002>
- Schäfer-Korting, M., Bock, U., Diembeck, W., Düsing, H.-J., Gamer, A., Haltner-Ukomadu, E., Hoffmann, C., Kaca, M., Kamp, H., Kersen, S., Kietzmann, M., Korting, H.C., Krächter, H.-U., Lehr, C.-M., Liebsch, M., Mehling, A., Müller-Goymann, C., Netzlaff, F., Niedorf, F., Rübhelke, M.K., Schäfer, U., Schmidt, E., Schreiber, S., Spielmann, H., Vuia, A., Weimer, M., 2008. The Use of Reconstructed Human Epidermis for Skin Absorption Testing: Results of the Validation Study. *Altern. Lab. Anim.* 36, 161–187. <https://doi.org/10.1177/026119290803600207>
- Schmook, F.P., Meingassner, J.G., Billich, A., 2001. Comparison of human skin or epidermis models with human and animal skin in in-vitro percutaneous absorption. *Int. J. Pharm.* 215, 51–56. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(00\)00665-7](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(00)00665-7)
- Schreiber, S., Mahmoud, A., Vuia, A., Rübhelke, M.K., Schmidt, E., Schaller, M., Kandárová, H., Haberland, A., Schäfer, U.F., Bock, U., Korting, H.C., Liebsch, M., Schäfer-Korting, M., 2005. Reconstructed epidermis versus human and animal skin in skin absorption studies. *Toxicol. In Vitro* 19, 813–822. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2005.04.004>
- Scott, A., Kalz, F., 1956. The Penetration and Distribution of C14-Hydrocortisone in Human Skin After Its Topical Application1. *J. Invest. Dermatol.* 26, 149–158. <https://doi.org/10.1038/jid.1956.20>
- Skobe, M., Detmar, M., 2000. Structure, function, and molecular control of the skin lymphatic system. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.* 5, 14–19. <https://doi.org/10.1046/j.1087-0024.2000.00001.x>
- Slaughter, M.S., Rogers, J.G., Milano, C.A., Russell, S.D., Conte, J.V., Feldman, D., Sun, B., Tatoes, A.J., Delgado, R.M., Long, J.W., Wozniak, T.C., Ghumman, W., Farrar, D.J., Frazier, O.H., 2009. Advanced Heart Failure Treated with Continuous-Flow Left Ventricular Assist Device. *N. Engl. J. Med.* 361, 2241–2251. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0909938>
- Snell, G.I., Westall, G.P., 2011. Selection and Management of the Lung Donor. *Clin. Chest Med.* 32, 223–232. <https://doi.org/10.1016/j.ccm.2011.02.002>
- Solon, E.G., 2015. Autoradiography techniques and quantification of drug distribution. *Cell Tissue Res.* 360, 87–107. <https://doi.org/10.1007/s00441-014-2093-4>

- Solon, E.G., 2012. Use of Radioactive Compounds and Autoradiography to Determine Drug Tissue Distribution. *Chem. Res. Toxicol.* 25, 543–555. <https://doi.org/10.1021/tx200509f>
- Sørensen, I.S., Janfelt, C., Nielsen, M.M.B., Mortensen, R.W., Knudsen, N.Ø., Eriksson, A.H., Pedersen, A.J., Nielsen, K.T., 2017. Combination of MALDI-MSI and cassette dosing for evaluation of drug distribution in human skin explant. *Anal. Bioanal. Chem.* 409, 4993–5005. <https://doi.org/10.1007/s00216-017-0443-2>
- Stock, S.R., 1999. X-ray microtomography of materials. *Int. Mater. Rev.* 44, 141–164. <https://doi.org/10.1179/095066099101528261>
- Stumpf, W.E., Hayakawa, N., Bidmon, H.-J., 2008. Skin research and drug localization with receptor microscopic autoradiography. *Exp. Dermatol.* 17, 133–138. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2007.00636.x>
- Sung, K.E., Yang, N., Pehlke, C., Keely, P.J., Eliceiri, K.W., Friedl, A., Beebe, D.J., 2011. Transition to invasion in breast cancer: a microfluidic in vitro model enables examination of spatial and temporal effects. *Integr Biol* 3, 439–450. <https://doi.org/10.1039/C0IB00063A>
- Thiery, C., 2013. Tomographie à rayons X. *Tech. Ing. CND Méthodes Glob. Vol.*
- Thomsen, M., Poulsen, M., Bech, M., Velroyen, A., Herzen, J., Beckmann, F., Feidenhans'l, R., Pfeiffer, F., 2012. Visualization of subcutaneous insulin injections by x-ray computed tomography. *Phys. Med. Biol.* 57, 7191–7203. <https://doi.org/10.1088/0031-9155/57/21/7191>
- Touitou, E., Fabin, B., Dany, S., Almog, S., 1988. Transdermal delivery of tetrahydrocannabinol. *Int. J. Pharm.* 43, 9–15. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(88\)90052-X](https://doi.org/10.1016/0378-5173(88)90052-X)
- Tremblay, P.-L., Hudon, V., Berthod, F., Germain, L., Auger, F.A., 2005. Inosculation of tissue-engineered capillaries with the host's vasculature in a reconstructed skin transplanted on mice. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* 5, 1002–1010. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2005.00790.x>
- Ulmann, L., Rodeau, J.-L., Danoux, L., Contet-Audonneau, J.-L., Pauly, G., Schlichter, R., 2007. Trophic effects of keratinocytes on the axonal development of sensory neurons in a coculture model: Effect of keratinocytes on sensory neuron growth. *Eur. J. Neurosci.* 26, 113–125. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2007.05649.x>
- Van Raemdonck, D., Neyrinck, A., Rega, F., Devos, T., Pirenne, J., 2013. Machine perfusion in organ transplantation: a tool for ex-vivo graft conditioning with mesenchymal stem cells? *Curr. Opin. Organ Transplant.* 18, 24–33. <https://doi.org/10.1097/MOT.0b013e32835c494f>
- Van Raemdonck, D., Neyrinck, A., Verleden, G.M., Dupont, L., Coosemans, W., Decaluwe, H., Decker, G., De Leyn, P., Nafteux, P., Lerut, T., 2009. Lung Donor Selection and Management. *Proc. Am. Thorac. Soc.* 6, 28–38. <https://doi.org/10.1513/pats.200808-098GO>

- Van Ravenzwaay, B., Leibold, E., 2004. A comparison between in vitro rat and human and in vivo rat skin absorption studies. *Hum. Exp. Toxicol.* 23, 421–430. <https://doi.org/10.1191/0960327104ht471oa>
- Verma, P., Thakur, A., S., Deshmukh, K., Jha, A.K., Verma, S., 2010. Routes of drug administration. *Int. J. Pharm. Stud. Res.* 1, 54–59.
- Wester, R.C., Christoffel, J., Hartway, T., Poblete, N., Maibach, H.I., Forsell, J., 1998. Human Cadaver Skin Viability for In Vitro Percutaneous Absorption: Storage and Detrimental Effects of Heat-Separation and Freezing. *Pharm. Res.* 15, 82–84. <https://doi.org/10.1023/A:1011904921318>
- Whitesides, G.M., 2006. The origins and the future of microfluidics. *Nature* 442, 368–373. <https://doi.org/10.1038/nature05058>
- Williams, S.-P., 2012. Tissue distribution studies of protein therapeutics using molecular probes: molecular imaging. *AAPS J.* 14, 389–399. <https://doi.org/10.1208/s12248-012-9348-3>
- Xiao, S., Coppeta, J.R., Rogers, H.B., Isenberg, B.C., Zhu, J., Olalekan, S.A., McKinnon, K.E., Dokic, D., Rashedi, A.S., Haisenleder, D.J., Malpani, S.S., Arnold-Murray, C.A., Chen, K., Jiang, M., Bai, L., Nguyen, C.T., Zhang, J., Laronda, M.M., Hope, T.J., Maniar, K.P., Pavone, M.E., Avram, M.J., Sefton, E.C., Getsios, S., Burdette, J.E., Kim, J.J., Borenstein, J.T., Woodruff, T.K., 2017. A microfluidic culture model of the human reproductive tract and 28-day menstrual cycle. *Nat. Commun.* 8, 14584. <https://doi.org/10.1038/ncomms14584>
- Zhang, E.Z., Povazay, B., Laufer, J., Alex, A., Hofer, B., Pedley, B., Glittenberg, C., Treeby, B., Cox, B., Beard, P., Drexler, W., 2011. Multimodal photoacoustic and optical coherence tomography scanner using an all optical detection scheme for 3D morphological skin imaging. *Biomed. Opt. Express* 2, 2202–2215. <https://doi.org/10.1364/BOE.2.002202>