



HAL
open science

Développement de tissus vasculaires par bioimpression 3D

Chloé Devillard

► **To cite this version:**

Chloé Devillard. Développement de tissus vasculaires par bioimpression 3D. Biotechnologie. Université de Lyon, 2021. Français. NNT : 2021LYSE1339 . tel-03770219

HAL Id: tel-03770219

<https://theses.hal.science/tel-03770219>

Submitted on 6 Sep 2022

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.



N° d'ordre NNT : 2021LYSE1339

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON
opérée au sein de
l'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale N° 205
Ecole Doctorale Interdisciplinaire Sciences-Santé

Spécialité de doctorat : Biotechnologie

Soutenue publiquement le 17 Décembre 2021, par :

Chloé DEVILLARD

**Développement de tissus vasculaires
par la technologie de bioimpression 3D**

Devant le jury composé de :

Pinzano, Astrid
Malaquin, Laurent
Chevallier, Nathalie
Connes, Philippe
Marquette, Christophe

Directrice de Recherche, CNRS
Directeur de Recherche, CNRS
Chargée de Recherche, INSERM
Professeur des Universités, UCBL
Directeur de Recherche, CNRS

Rapporteuse
Rapporteur
Examinatrice
Examineur
Directeur de thèse

Université Claude Bernard – LYON 1

Président de l'Université	M. Frédéric FLEURY
Président du Conseil Académique	M. Hamda BEN HADID
Vice-Président du Conseil d'Administration	M. Didier REVEL
Vice-Président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire	M. Philippe CHEVALLIER
Vice-Président de la Commission de Recherche	M. Petru MIRONESCU
Directeur Général des Services	M. Pierre ROLLAND

COMPOSANTES SANTE

Département de Formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine	Directrice : Mme Anne-Marie SCHOTT
Faculté d'Odontologie	Doyenne : Mme Dominique SEUX
Faculté de Médecine et Maïeutique Lyon Sud - Charles Mérieux	Doyenne : Mme Carole BURILLON
Faculté de Médecine Lyon-Est	Doyen : M. Gilles RODE
Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation (ISTR)	Directeur : M. Xavier PERROT
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques (ISBP)	Directrice : Mme Christine VINCIGUERRA

COMPOSANTES & DEPARTEMENTS DE SCIENCES & TECHNOLOGIE

Département Génie Electrique et des Procédés (GEP)	Directrice : Mme Rosaria FERRIGNO
Département Informatique	Directeur : M. Behzad SHARIAT
Département Mécanique	Directeur M. Marc BUFFAT
Ecole Supérieure de Chimie, Physique, Electronique (CPE Lyon)	Directeur : Gérard PIGNAULT
Institut de Science Financière et d'Assurances (ISFA)	Directeur : M. Nicolas LEBOISNE
Institut National du Professorat et de l'Education	Administrateur Provisoire : M. Pierre CHAREYRON
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1	Directeur : M. Christophe VITON
Observatoire de Lyon	Directrice : Mme Isabelle DANIEL
Polytechnique Lyon	Directeur : Emmanuel PERRIN
UFR Biosciences	Administratrice provisoire : Mme Kathrin GIESELER
UFR des Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives (STAPS)	Directeur : M. Yannick VANPOULLE
UFR Faculté des Sciences	Directeur : M. Bruno ANDRIOLETTI

REMERCIEMENTS

Après toute cette aventure de Thèse digne d'une série aux mille rebondissements, je tenais à remercier toutes les personnes qui ont croisé mon chemin et ont été à mes côtés durant ces années.

Alors merci à Christophe, sans hésitation le meilleur directeur de thèse que l'on puisse avoir. Merci de m'avoir fait confiance dès mon stage de Master et surtout d'avoir toujours été présent malgré des épisodes assez particulier.

Merci aux membres de mon jury, le Dr Astrid Pinzano et le Dr Laurent Malaquin pour avoir accepté de lire et rapporter mes travaux de thèse, ainsi que le Dr Nathalie Chevalier et le Pr Philippe Connes pour avoir discuté et jugé ces travaux.

Merci à l'ensemble de l'équipe GEMBAS de l'ICBMS pour m'avoir accompagné durant mon stage puis lors de ma thèse : Agnès D, Agnès GE, Bastien, Marjorie, Guillaume, Béa, Ofélia, Fred et le Pr Loïc Blum pour m'avoir accueilli au sein de son équipe durant toute ces années.

Merci à toute la team 3d.FAB. Ca va être compliqué de citer toutes les personnes qui sont passées par là durant ces années ! Alors mes remerciements les plus profonds :

- À Céline, qui m'a encadré dès mon arrivée au labo et qui a fait preuve d'une grande gentillesse.
- À Emma, avec qui j'ai partagé des longues manip' de folie et toujours dans la bonne ambiance (#co-axial la base)
- À Edwin qui a su m'écouter et m'aider dans des moments compliqués.
- À Arthur (et kikooo !) pour nos discussions à rallonge sur tout et rien
- Et à tous les stagiaires et doctorants qui sont passés par là : Sarah, Laura, Meig, Hamza, Lucas, Audrey...

Merci à toutes les personnes qui ont participé à ce projet :

- Adrien Grelet de chez Tobeca® pour nous avoir aidé durant le concours Solvay et pour nous avoir conçu des pneumatiques trop cool !
- Naima, pour les milliards de coupes et marquages histologiques
- Elisabeth Errazuriz-Cerda, pour les observations au MET
- Denis Ressnikoff, pour la formation de microscopie confocale
- Anne Baudouin, pour les essais RMN

Merci à toute l'équipe administrative, clairement toujours au top pour répondre à nos demandes avec une efficacité rare : Patrick, Sybil, Simona, Christine, Régine, Marion. Un merci tout particulier à Fred, t'es vraiment la meilleure.

A mes co-thésards et tout particulièrement merci à Juju avec qui j'ai débuté toute cette aventure. Jipé de toutes nos conversations et nos dramas dans le bureau du bonheur. Merci pour toutes tes activités (#lemotdujour ou encore #maisc'estou) nous permettant de nous coucher moins bêtes.

Merci également à Cloclo (la grande), Yani, Pierre, Laurent, avec qui la MDH à pris tout son sens, merci pour toutes nos soirées escape game et toutes nos binch'. Ces moments étaient clairement des pépites !

Merci à toi, Léa, qui a toujours été là du début à la fin de ma thèse, même à des centaines de km du labo ! J'oublierai jamais nos heures de discussions téléphoniques et de manips à distance en train de passer nos petites cellules dans le P2.

Merci à Ala et Anna pour votre gentillesse remarquable. Merci d'avoir croisé mon chemin.

Merci à Nico, Sebiba, Toto, Numa, Laëtitia, Romain, Layth, Ariana. J'espère que vous ferez perdurer le groupe CoronaDomus.

Merci à tous mes amis. A toi Lucas (aka mon Pon), tmtc c'était pas easy cette histoire mais tu as été d'un soutien rare et je ne t'en remercierais jamais assez. Merci bien sûr à Marmar, Arthur, Juju et Chacha, mes amis les plus précieux. Merci à toute la team des Thug pour nos toutes ces soirées et voyages qui m'ont fait si du bien.

Merci à toute ma famille, ma belle-famille, pour m'avoir toujours demandé comment ça se passait même si je sais que ce n'était pas toujours évident à comprendre.

Merci Papa, merci Maman, pour votre confiance et votre soutien qui m'ont permis d'en arriver jusqu'ici.

Merci Théo, merci Lola, mes frères et sœurs préférés que j'aime si fort !

Merci Florian, pour tout. Le meilleur reste à venir.

TABLE DES MATIÈRES

Table des matières

TABLE DES MATIÈRES	7
ABREVIATIONS.....	17
INTRODUCTION GÉNÉRALE	21
CHAPITRE I : ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	27
I. La formation d'un nouveau tissu.....	29
I.1. L'inflammation.....	30
I.2. La prolifération et la réparation	31
I.2.1. Formation du tissu de granulation	31
I.2.2. La néovascularisation	32
i. Vasculogénèse : formation d'un réseau primitif.....	33
ii. Angiogénèse : germination et remodelage.....	34
iii. Myogénèse vasculaire : recrutement des cellules murales	34
iv. Artériogénèse : stabilisation vasculaire.....	35
I.2.3. La contraction tissulaire	35
I.3. Le remodelage tissulaire.....	35
II. Structure et physiologie du vaisseau sanguin	36
II.1. Le réseau vasculaire.....	37
II.2. Artères et veines.....	38
II.2.1. Physiologie	38
II.2.2. Histologie.....	39
II.3. Artérioles et veinules.....	40
II.3.1. Physiologie	40
II.3.2. Histologie.....	40
II.4. Capillaires	40
II.4.1. Physiologie	40
II.4.2. Histologie.....	41
III. Les cellules vasculaires	41
III.1. Les cellules endothéliales	41
III.1.1. Structure.....	41
III.1.2. Fonctions	42
III.1.3. Histochimie et cytochimie.....	43
III.2. Les cellules musculaires lisses vasculaires.....	44
III.2.1. Structure.....	44

III.2.2.	Fonctions	44
III.2.3.	Histochimie et cytochimie.....	45
III.3.	Les fibroblastes.....	46
III.3.1.	Structure.....	46
III.3.2.	Fonctions	46
III.3.3.	Histochimie et cytochimie.....	48
III.4.	Les péricytes	49
III.4.1.	Structure.....	49
III.4.2.	Fonctions	49
III.4.3.	Histochimie et cytochimie.....	50
III.5.	Le système d'interaction cellulaire complexe	51
III.5.1.	La co-culture.....	51
III.5.2.	Les conditions de culture	52
III.5.3.	La communication cellule-cellule.....	53
i.	Les cellules endothéliales et les fibroblastes	53
ii.	Les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses vasculaires	57
iii.	Les cellules endothéliales et les péricytes.....	60
Le recrutement des péricytes.....	61	
La maturation des vaisseaux sanguins	61	
La différenciation des péricytes	62	
IV.	Les biomatériaux, composant de la bioencres	63
IV.1.	L'alginate	64
IV.1.1.	Description	64
IV.1.2.	Utilisation en bioimpression 3D.....	66
IV.2.	La gélatine.....	67
IV.2.1.	Description	67
IV.2.2.	Utilisation en bioimpression 3D.....	68
IV.3.	Le fibrinogène.....	69
IV.3.1.	Description	69
IV.3.2.	Utilisation en bioimpression 3D.....	71
V.	La biofabrication de tissus vasculaires	72
V.1.	Ingénierie tissulaire macrovasculaire	73
V.1.1.	Les premiers travaux effectués	73
V.1.2.	Les biomatériaux	74
V.1.3.	Les techniques de biofabrication	76

i.	Ingénierie macrovasculaire classique.....	77
	Les feuillets cellulaires.....	77
	Le moulage	78
	L'échafaudage	80
ii.	Ingénierie macrovasculaire avancée	86
	La bioimpression 3D : définition.....	86
	La bioimpression 3D par jet d'encre.....	87
	La bioimpression 3D par extrusion.....	88
	Les différentes techniques de biofabrication macrovasculaire	91
V.2.	Ingénierie tissulaire microvasculaire	104
V.2.1.	Source de biomatériaux	104
V.2.2.	Techniques de biofabrication.....	106
i.	Stimulation angiogénique in vivo	106
ii.	Décellularisation et recellularisation.....	107
iii.	Microvascularisation artificielle implantable	108
iv.	Tissu vascularisé in vitro	109
	L'approche Top-Down	109
	L'approche <i>bottom-Up</i>	113
VI.	La maturation des tissus vasculaires	121
VI.1.	Le microenvironnement cellulaire.....	122
VI.1.1.	Définition.....	122
VI.1.2.	Les limitations : la maturation passive	123
VI.2.	La maturation dynamique	125
VI.2.1.	Les bioréacteurs : définition.....	125
VI.2.2.	Les bioréacteurs : la conception.....	126
VI.2.3.	Les bioréacteurs : la stratégie de maturation	128
VII.	Conclusions & Objectifs	132
CHAPITRE II : MATÉRIEL & MÉTHODES		135
I.	Culture 2D des cellules vasculaires	137
I.1.	Les NIH 3T3 eGFP.....	137
I.2.	Les cellules endothéliales.....	137
I.3.	Les fibroblastes	138
I.4.	Les cellules musculaires lisses vasculaires.....	138
II.	Biofabrication du tissu vasculaire	139
II.1.	Hydrogel support en microparticules de gélatine	139
II.2.	Préparation de la bioencre.....	140

II.2.1.	Préparation des solutions mères	140
II.2.2.	Préparation des cellules vasculaires	140
<i>i.</i>	<i>Méthode directe</i>	141
<i>ii.</i>	<i>Méthode indirecte</i>	142
II.3.	Bioimpression 3D	142
II.3.1.	Préparation de la seringue d'impression	142
II.3.2.	Imprimante 3D : TOBECA®	143
II.3.3.	Logiciel d'impression 3D : Repetier-Host	143
II.3.4.	Consolidation de l'objet 3D	146
II.4.	Suivi post-impression : maturation tissulaire	147
III.	Méthodes de caractérisation	148
III.1.	Imprimabilité de la bioencres : rhéologie	148
III.2.	Adhésion et prolifération des cellules : calcéine AM	148
III.3.	Histologie	149
III.3.1.	Préparation du tissu.....	150
III.3.2.	Colorations et marquages.....	150
<i>i.</i>	<i>Les colorations</i>	150
<i>ii.</i>	<i>Les marquages</i>	151
III.4.	Observations microscopiques	153
III.4.1.	Microscopie confocale.....	153
III.4.2.	Microscopie Electronique à Transmission (MET).....	153
III.5.	ELISA : méthode par chimiluminescence	154
CHAPITRE III : DÉVELOPPEMENT ET OPTIMISATION D'UNE BIOENCRES		157
I.	Contexte et objectifs	159
II.	Bioencres de collagène issu de méduse	160
I.1.	Etude de formulation	160
I.2.	Limitations et solutions	162
II.	Bioencres de collagène humain de type I	164
II.1.	Etude de formulation	164
II.2.	Amélioration du procédé de formulation	165
II.2.1.	Stabilité de l'objet après impression	165
II.2.2.	Mélange avec des cellules	166
<i>i.</i>	Utilisation du système de centrifugation	166
<i>ii.</i>	Utilisation d'un système coaxial	167
III.	La bioencres finale.....	174

III.1.	La formulation	178
III.2.	La consolidation.....	183
III.3.	Le développement cellulaire	187
IV.	Résumé des propriétés de la nouvelle bioencres	191
V.	Conclusions.....	195
CHAPITRE IV : TECHNIQUES DE BIOFABRICATION POUR LE TISSU VASCULAIRE.....		197
I.	Contexte et objectifs	199
II.	La bioimprimante 3D.....	200
II.1.	Les bioimprimantes commerciales.....	200
II.2.	Développement d'une bioimprimante 3D adaptée	202
III.	Les différentes stratégies de bioimpression 3D.....	205
III.1.	La biofabrication tubulaire	206
III.1.1.	Le cahier des charges	206
III.1.2.	La bioimpression par microextrusion à 1 extrudeur	206
i.	Etude de faisabilité.....	206
ii.	Limites et solutions.....	208
III.1.3.	L'impression 4D.....	209
i.	Etude de faisabilité.....	210
ii.	Limites et solutions.....	215
III.1.4.	La bioimpression en milieu contraint.....	216
i.	Etude de faisabilité.....	217
ii.	Limites et solutions.....	218
III.1.5.	La bioimpression multicouche par enroulement	220
i.	Etude de faisabilité.....	221
ii.	Limites et solutions.....	222
III.1.6.	La bioimpression coaxiale	223
i.	Etude de faisabilité.....	224
ii.	Limites et solutions.....	225
III.1.7.	La bioimpression triaxiale	228
i.	Etude de faisabilité.....	228
ii.	Limites et solutions.....	230
III.1.8.	La bioimpression par microextrusion multi-extrudeur	232
i.	Prototype v1.....	233
	Etude de faisabilité.....	233
	Limites et solutions.....	234

ii.	Prototype v2.....	235
	Etude de faisabilité.....	235
	Limites et solutions.....	235
iii.	Prototype v3.....	236
	Etude de faisabilité.....	236
	Limites et solutions.....	238
iv.	Prototype v4.....	239
	Etude de faisabilité.....	239
	Limites et solutions.....	240
III.1.9.	Conclusions	241
III.2.	La biofabrication plane.....	242
III.2.1.	Le cahier des charges	242
III.2.2.	La bioimpression 3D par microextrusion	243
	i. Etude de faisabilité.....	243
	ii. Limites et solutions.....	244
III.2.3.	La bioimpression 4D.....	245
	i. Etude de faisabilité.....	246
	ii. Limites et solutions.....	248
III.2.4.	Conclusions	250
IV.	Tableau récapitulatif des différentes techniques.....	252
V.	Conclusions et perspectives.....	257
CHAPITRE V : BIOFABRICATION <i>IN VITRO</i> D'UN TISSU MICROVASCULARISÉ.....		259
I.	Contexte et objectifs	261
II.	La communication cellulaire : impact sur le développement tissulaire.....	261
II.1.	Fibroblastes seuls dans la bioencore	262
II.2.	HUVEC seules dans la bioencore	265
II.3.	Fibroblastes et HUVEC en co-culture dans la bioencore	268
II.4.	Fibroblastes et HUVEC en co-culture indirecte	270
II.5.	Communication croisée ou unidirectionnelle ?.....	272
II.6.	Conclusions.....	275
III.	L'organisation cellulaire : caractérisations histologiques.....	277
III.1.	L'organisation structurale.....	277
	III.1.1. La coloration Hématoxyline et Eosine.....	277
	III.1.2. La coloration Trichrome de Masson.....	278
	III.1.3. Témoin négatif : bioencore acellulaire.....	278

III.1.4.	Hydrogel de fibroblastes	279
i.	Coloration H&E.....	279
ii.	Coloration Trichrome de Masson.....	280
III.1.5.	Hydrogel de cellules endothéliales	281
i.	Coloration H&E.....	282
ii.	Coloration Trichrome de Masson.....	282
III.1.6.	Fibroblastes et HUVEC en co-culture indirecte.....	283
i.	Coloration Trichrome de Masson.....	284
III.1.7.	Fibroblastes et HUVEC en co-culture directe.....	285
i.	Coloration Hématoxyline et Eosine.....	285
ii.	Coloration Trichrome de Masson.....	287
III.1.8.	Conclusions	288
III.2.	L'organisation fonctionnelle.....	289
III.2.1.	Les myofibroblastes : α -SMA.....	290
III.2.2.	La microvascularisation : EN4.....	292
III.2.3.	Les péricytes : NG2.....	298
III.2.4.	Conclusions	300
IV.	L'ultrastructure tissulaire : matrice extracellulaire	301
IV.1.	Contraction tissulaire	301
IV.2.	Microscopie Electronique à Transmission.....	304
IV.3.	Marquage histologique.....	309
IV.4.	Conclusions.....	311
V.	Etudes des facteurs angiogéniques sécrétés dans l'environnement	311
VI.	Complexification du tissu bioimprimé	320
VI.1.	Environnement de culture optimal	320
VI.2.	Contraction tissulaire	322
VI.3.	Fibroblastes, HUVEC et CMLV : les communications.....	324
VI.4.	Développement tissulaire.....	326
VI.4.1.	Microscope optique	326
VI.4.2.	Coloration Hématoxyline et Eosine.....	327
VI.4.3.	Coloration Trichrome de Masson.....	328
VI.4.4.	Marquage EN4.....	329
VI.5.	Conclusions.....	330
VII.	Conclusions.....	331
	CONCLUSIONS GÉNÉRALES ET PERSPECTIVES.....	335

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	343
PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES.....	389
COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES	393

ABRÉVIATIONS

2D/3D/ 4D	Deux Dimensions /Trois Dimensions / Quatre Dimensions
α -SMA	α -Smooth Muscle Actin
Alk-1/Alk-5	Activin receptor-like kinase 1 / Activin receptor-like kinase 5
Ang-1/Ang-2	Angiopoiétine-1 / Angiopoiétine-2
bFGF	basic Fibroblast Growth Factor
CaCl ₂	Chlorure de Calcium
CAO	Conception Assistée par Ordinateur
CD 31	Cluster de Différenciation 31
CE	Cellules Endothéliales
CMLV	Cellules Musculaires Lisses Vasculaires
CPE	Cellules Progénitrices Endothéliales
DMEM	Dulbecco's Modified Eagles Medium
EGF	Epidermal Growth Factor
EGM2	Endothelial cell Growth Medium 2
EN4	Anti-Endothelium antibody
FDM	Fused Deposition Modelling
FRESH	Freeform Reversible Embedded Support Hydrogel
GFP	Green Fluorescent Protein
HE	Hématoxyline-Eosine
HIF	Hypoxia Inducible Factor
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cells
IF	Immunofluorescence
IL-1/II-6/IL-8	Interleukine-1 / interleukine-6 / Interleukine-8
LEI	Limite Elastique Interne
MEBE	Microscopie Electronique à Balayage Environnementale
MEC	Matrice Extracellulaire
MET	Microscopie Electronique à Transmission
MMP	Matrix Metalloproteinase

NO	Nitric Oxyde
PBS	Phosphate Buffered Saline
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor
PECAM	Platelet Endothelial Cell Adhesive Molecule-1
PFA	ParaFormAldehyde
RGD	Arginine-Glycine-Aspartate
S1P	Sphingosine-1-Phosphate
SmBM2	Smooth Muscle cell Basal Medium 2
STL	Standard Tessellation Language
TIMP	Tissue Inhibitor of MetalloProteinases
TM	Trichrome de Masson
TNF- α	Tumor Necrosis Factor- α
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VSIT	Vaisseau Sanguin d'Ingénierie Tissulaire
vWF	Von Willebrand Factor

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Après plus d'un demi-siècle de recherches dans le domaine de l'ingénierie tissulaire et de la médecine régénérative, un obstacle persiste : la biofabrication *in vitro* de tissus vasculaires de grande échelle ($> 1 \text{ cm}^3$) pour répondre aux besoins cliniques qui ne cessent d'augmenter mais aussi pour répondre aux problématiques de recherches scientifiques fondamentales avec l'apport de modèles biologiques plus pertinents et spécifiques. Par conséquent, la demande de vaisseaux sanguins issus de la bioingénierie continue de croître et les options actuelles de conception vasculaire restent limitées. Cela fait de ce domaine un véritable défi avec des exigences avancées pour l'aboutissement à un tissu vasculaire biologiquement pertinent et fonctionnel. Ces exigences regroupent notamment la distribution, l'adhésion, la migration et l'auto-organisation des cellules à l'intérieur de structures en trois dimensions, mais aussi la capacité de ces cellules à fabriquer une matrice extracellulaire en parallèle pour maintenir le tissu sur le long terme¹.

La taille des vaisseaux sanguins varie considérablement en fonction de leur localisation dans l'arbre vasculaire. Les artères et les veines faisant partie de la catégorie des gros vaisseaux (diamètre supérieur à 6 mm) permettent un transport efficace sur de longues distances alors que les capillaires faisant partie des petits vaisseaux (diamètre inférieur à 6 mm) sont organisés pour un échange optimal d'oxygène, de nutriments et de déchets à travers les tissus. De ce fait, il n'est pas surprenant de constater que les exigences et les approches de conception pour l'ingénierie de ces vaisseaux soient complètement différentes.

Concernant la macrovascularisation (diamètre $> 6 \text{ mm}$), l'accent est porté sur la représentation de l'architecture et de la composition de la paroi vasculaire. En effet, la paroi de ces vaisseaux est organisée en trois couches concentriques appelées tuniques. De l'extérieur vers l'intérieur de la paroi vasculaire nous retrouvons : la tunique externe ou *adventice*, la tunique du milieu ou *media*, et la tunique interne ou *intima*. Ces couches sont respectivement composées de fibroblastes piégés dans une matrice extracellulaire, puis de cellules musculaires lisses vasculaires et enfin de cellules endothéliales formant l'endothélium vasculaire.

Les années 1950 ont été les témoins de l'apparition des greffons vasculaires de génie tissulaire destinés à remplacer les vaisseaux artériels occlus à la suite de complications chirurgicales. Ils ont pour avantage de faire face à la pénurie fréquente de greffes allogéniques et permettent de réduire le rejet immunologique suite à des greffes de vaisseaux sanguins d'origine animale.

Cependant, malgré les progrès à cette époque en pharmacologie, en science des matériaux et en biofabrication de dispositifs, ces greffons vasculaires de génie tissulaire n'ont pas permis de réduire de manière significative la mortalité et la morbidité². Ces conséquences sont notamment dûes à l'utilisation de polymères synthétiques, non biodégradables et acellulaires. Cette approche a donc soulevé le besoin réel d'utiliser des constructions cellularisées. En effet, la formation naturelle et le maintien de vaisseaux sanguins fonctionnels est un processus cellulaire actif causé par la croissance, la mort et la migration des cellules à l'intérieur des biomatériaux, ainsi que par des changements structuraux dans les tissus *via* la dégradation et la production de la matrice extracellulaire par les cellules constituant le vaisseau sanguin³⁻⁵. Pour répondre à ce besoin, le développement de conduits vasculaires cellulaires et biodégradables par ingénierie tissulaire a fait son arrivée. Cette technique utilise des cellules endothéliales et des cellules musculaires lisses vasculaires incluent dans des biomatériaux de type matrice extracellulaire^{6,7}. Malheureusement, cette approche rencontre elle aussi des points faibles notamment en regard des propriétés mécaniques non satisfaisantes des vaisseaux obtenus pour répondre aux besoins de greffes. L'ingénierie tissulaire fait cependant un progrès dans les années 90, en comprenant que la simple utilisation de cellules vasculaires vivantes associées à une matrice de biomatériaux n'est pas suffisante pour aboutir à un vaisseau sanguin fonctionnel. Les recherches en ingénierie vasculaire se sont alors concentrées sur la compréhension plus fondamentale des composants structurels d'un vaisseau sanguin, augmentant l'adhésion cellulaire et la cohésion tissulaire. Ces notions apparaissent alors vitales pour la conception et la formulation rationnelle de biomatériaux ainsi que pour le choix de la source cellulaire vasculaire appropriée.

En résumé, la structure complexe de la paroi vasculaire, les sources cellulaires, les signaux chimiques et biochimiques requis, font de la construction *in vitro* de vaisseaux sanguins un défi majeur. Pour atteindre cet objectif, le vaisseau sanguin devra être biocompatible, biodégradable, posséder des propriétés mécaniques et une perméabilité suffisante et enfin être de taille variable en fonction du tissu. Plusieurs techniques de biofabrications ont vu le jour depuis les années 1950 pour essayer de répondre à ces attentes : l'utilisation de feuillets cellulaires enroulés autour d'un mandrin, le moulage direct, l'électrofilage, l'ensemencement cellulaire d'échafaudages et dernièrement, la bioimpression.

Concernant la microvascularisation (diamètre < 6 mm), les approches de reconstruction ne sont pas les mêmes. Lorsque des tissus sont lésés ou doivent être remplacés, la médecine régénérative permet alors de répondre à ces besoins. En effet, grâce à l'ingénierie tissulaire d'aujourd'hui, des substituts biologiques peuvent être biofabriqués pour remplacer ces tissus. Les principales méthodes utilisées pour réparer ces tissus sont : (i) l'injection de cellules, soit du même individu (autologue), soit d'un autre individu (allogénique), soit d'une espèce différente (xénogénique), (ii) la biofabrication d'échafaudages acellulaires et (iii) la biofabrication d'échafaudages cellularisés^{8,9}. Cependant, ces méthodes sont applicables uniquement dans le cas de tissus fins et/ou avasculaires. En effet, la peau, le cartilage, ou encore la cornée peuvent être transplantés puis rapidement vascularisés à partir du système vasculaire de l'hôte¹⁰⁻¹². Mais dans le cas de tissus plus épais, c'est-à-dire supérieurs à 1 cm, le manque de pré-vascularisation est un réel problème. Ce déficit de vascularisation est un frein aussi bien pour la transplantation, avec une diminution de la survie du greffon *in vivo*, que pour la recherche expérimentale avec des modèles tissulaires *in vitro* de faible stabilité et pertinence biologique.

C'est pourquoi il est nécessaire aujourd'hui de reconstruire des tissus dotés d'une microvascularisation grâce à l'utilisation de biomatériaux, de cellules et de techniques de biofabrications adaptées.

Les objectifs de ces travaux de thèse ont été, dans un premier temps, de développer et d'optimiser une bioencres composée de trois polymères : la gélatine, l'alginate et le fibrinogène. Puis, dans un deuxième temps, de développer différentes techniques de biofabrication par bioimpression 3D permettant la construction de tissus vasculaires tubulaires et multicouche (macrovascularisation). Et en troisième temps, grâce à l'utilisation de la bioencres et de la technologie la bioimpression 3D, de développer un tissu vascularisé (microvascularisation) grâce à la compréhension des communications cellulaires complexes établies à l'intérieur de la structure 3D, stimulant une auto-organisation de ces cellules pour aboutir au développement d'un tissu mature.

Afin de répondre à cette problématique de biofabrication d'un tissu vasculaire fonctionnel et biologiquement pertinent et atteindre les objectifs exposés, quatre chapitres seront

développés dans ce manuscrit. Le premier portera sur une étude bibliographique complète pour contextualiser le projet de thèse. Cette étude introduira les étapes *in vivo* majeures permettant la formation d'un nouveau tissu avec un accent sur la nécessité de création d'une vascularisation à l'intérieur de ce nouveau tissu. La structure et la physiologie des différents vaisseaux sanguins du réseau vasculaire du corps humain ainsi que les différentes cellules les composants, seront décrites. Nous détaillerons les trois biomatériaux naturels que nous utiliserons lors de la formulation d'une bioencore de choix ainsi que les différentes cellules vasculaires. Cette étude décrira également les différentes stratégies de biofabrication macrovasculaire et microvasculaire adoptées à ce jour et nous soulignerons particulièrement la formation de vaisseaux sanguins tubulaires multicouches ainsi que la formation de vaisseaux sanguins type microvasculaires et l'importance de développer de nouvelles méthodes plus complexes pour répondre à ce besoin vital de vascularisation. Ce premier chapitre se conclura par un état de l'art de la maturation des tissus biofabriqués en trois dimensions, en particulier, la nécessité grandissante de comprendre les interactions cellules-cellules, cellules-biomatériaux, mais aussi l'interaction de ces cellules face à leur microenvironnement, qui influence de manière considérable leurs proliférations et leurs maturations au sein du tissu vasculaire.

Après un exposé au sein d'un deuxième chapitre des différentes méthodes et protocoles utilisés, les étapes de développement d'une bioencore optimale pour la fabrication d'un tissu vasculaire/vascularisé seront développées dans un troisième chapitre. Les différentes stratégies de biofabrications macrovasculaires par la technologie avancée de bioimpression 3D feront l'objet d'un quatrième chapitre. Enfin, le dernier chapitre présentera l'effet de la communication des cellules vasculaires sur le développement et la maturation d'un tissu fonctionnel *in vitro*. Un bilan des résultats obtenus au cours de cette thèse clôturera ce manuscrit et les perspectives offertes par ces travaux de recherches seront exposées.

CHAPITRE I : ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Dans ce premier chapitre d'étude bibliographique, nous allons débiter par un résumé des événements biologiques majeurs intervenant dans le processus de formation d'un nouveau tissu, avec un accent sur le processus de mise en place de la néovascularisation. La structure et la physiologie des vaisseaux sanguins sera décrite par la suite ainsi que la fonction des cellules composants ces vaisseaux. Les biomatériaux utilisés durant ces travaux de thèse pour la biofabrication vasculaire seront présentés. Enfin, nous détaillerons la pertinence de la macrovascularisation et de la microvascularisation ainsi que les stratégies actuelles mises en place pour développer ces tissus cellularisés d'une grande complexité.

I. La formation d'un nouveau tissu

Pour réussir à recréer un tissu vivant par une approche *in vitro*, il faut réussir à reproduire les événements physiologiques qui se déroulent *in vivo* lors du développement d'un nouveau tissu. Pour cela il est nécessaire dans un premier temps de comprendre les processus physiologiques permettant d'aboutir à la régénération d'un tissu, par exemple après une lésion. Dans son sens le plus large, la régénération tissulaire fait référence à tous les phénomènes de réparation du corps humain durant lesquels il peut retrouver son intégrité. La cicatrisation peut être ici considérée comme une modalité de la régénération tissulaire au sens large¹³.

Suite à l'endommagement d'un tissu, un processus de cicatrisation complexe est mis en route afin d'en restaurer la structure et la fonction. La Figure 1 résume les trois phases chevauchantes de réparation d'un tissu, composée de la phase d'inflammation, la phase de prolifération et enfin la phase de remodelage tissulaire¹⁴. La phase inflammatoire correspond à la fermeture des brèches vasculaires dues à la lésion du tissu grâce au développement d'un caillot de fibrine, la phase de prolifération correspond à la formation d'un tissu de granulation vascularisé et la phase de maturation, aussi appelée phase de remodelage, correspond au remplacement du tissu de granulation par un tissu conjonctif mature. La cicatrisation est un processus long pouvant durer plusieurs mois.

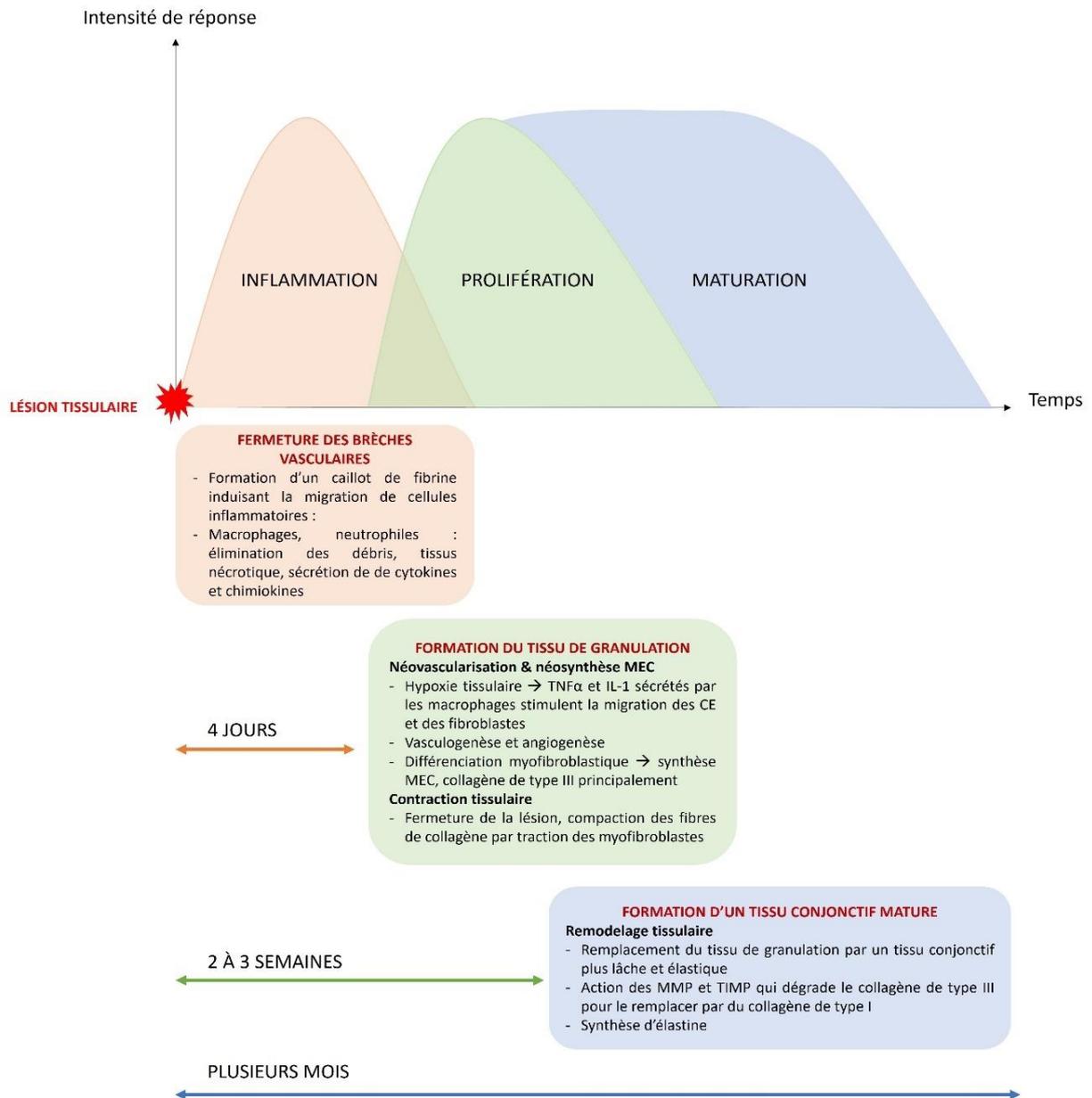


Figure 1 Représentation graphique des différentes phases de régénération d'un tissu après une lésion. Lorsqu'une lésion tissulaire apparaît, la phase d'inflammation permet la synthèse de cellules inflammatoires induisant le recrutement de fibroblastes et de cellules endothéliales et le déclenchement de la phase de prolifération et réparation tissulaire. Un tissu de granulation est alors développé grâce à la mise en place d'une matrice par les myofibroblastes et d'une néovascularisation par les cellules endothéliales. Le tissu de granulation subit une compaction par réarrangement des fibres de collagènes. Enfin, la phase de maturation, ou remodelage du tissu de granulation, correspond à la dernière étape du développement d'un tissu. Cette phase correspond à l'apoptose des cellules présentes dans le tissu de granulation (myofibroblastes et cellules endothéliales) et à la réorganisation de la matrice extracellulaire.

I.1. L'inflammation

La phase d'inflammation correspond à la première phase de réparation d'un tissu et survient directement après la lésion du tissu¹³. Elle permet de refermer la plaie *via* le développement

d'un caillot sanguin composé de fibrine, ainsi que d'éliminer les débris, les micro-organismes et les tissus nécrotiques grâce au recrutement de cellules inflammatoires (neutrophiles, macrophages). Ces cellules sécrètent également des facteurs tels que des cytokines et des chimiokines, permettant de déclencher l'étape suivante de la formation du nouveau tissu : la prolifération et réparation tissulaire.

1.2. La prolifération et la réparation

Cette étape a pour objectif d'aboutir au développement d'un tissu conjonctif provisoire appelé tissu de granulation, qui sera par la suite remodelé selon un processus plus lent en un tissu conjonctif mature durant la phase de maturation/remodelage.

1.2.1. Formation du tissu de granulation

Le développement d'un nouveau tissu conjonctif, le tissu de granulation, a lieu durant la phase de prolifération et se déclenche environ 4 jours après la lésion du tissu. Lors de sa formation, de nombreux macrophages et fibroblastes sont présents. En effet les macrophages vont permettre d'éliminer les débris suite à la lésion tissulaire mais aussi de stimuler la migration et la prolifération des fibroblastes *via* la libération de cytokines¹⁵.

Les fibroblastes sont donc recrutés grâce à ces facteurs mais aussi à cause d'un dérèglement d'autres facteurs environnementaux comme la pression partielle en oxygène ou encore la matrice extracellulaire. Effectivement, le cœur de la plaie et sa surface ne sont plus vascularisés et possèdent par conséquent une faible pression partielle en oxygène par rapport à la périphérie du tissu. Les fibroblastes vont alors migrer jusqu'aux zones hypoxiques. De plus, lors de la lésion tissulaire, de nombreux éléments de la matrice extracellulaire sont ainsi libérés. Notamment nous retrouvons de la fibronectine, qui joue un rôle important dans la migration et l'attachement des fibroblastes à la matrice. Ainsi la migration des fibroblastes jusqu'à la zone lésée se fait par détachement protéolytique de ces cellules de leur substrat. La production, par les cellules endothéliales, de l'activateur du plasminogène urokinase uPA est à l'origine de ce détachement protéolytique et donc de la migration des fibroblastes. Cette protéolyse est induite par la présence de facteurs tels que le PDGF, l'EGF et le FGF. Les fibroblastes vont ensuite proliférer pour néosynthétiser de la nouvelle matrice extracellulaire

et de la substance fondamentale (matrice extra-fibrillaire). Cette étape est induite par la présence de PDGF, puissant mitogène uniquement pour les cellules stromales^{16,17}.

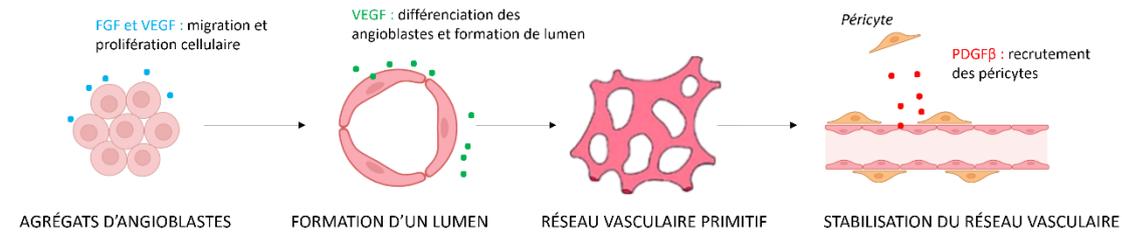
La néosynthèse matricielle par les fibroblastes est dépendante d'une néovascularisation par les cellules endothéliales. En effet, le développement d'une microvascularisation est essentiel pour permettre aux fibroblastes de survivre dans une zone hypoxique grâce à un apport de nutriments et d'oxygène. Sans ce développement, ils ne peuvent pas se différencier en myofibroblastes, le phénotype synthétisant la matrice.

1.2.2. La néovascularisation

Comme nous venons de le dire, le développement d'une vascularisation est vitale pour la reconstruction du tissu, permettant ainsi de délivrer des nutriments, de l'oxygène puis d'éliminer les déchets métaboliques. Les macrophages jouent un rôle important dans la néovascularisation en libérant de l'IL-1 et du TNF- α ^{18,19}. Ces facteurs angiogéniques vont ainsi être libérés à cause du phénomène d'hypoxie rencontré au sein du tissu. Ce phénomène d'hypoxie dans le tissu est très important car s'il est supprimé pour des essais expérimentaux, le développement d'une vascularisation ne sera pas possible²⁰.

Le développement d'une vascularisation à l'intérieur d'un tissu repose sur deux principaux mécanismes que sont la vasculogénèse et l'angiogénèse²¹ (Figure 2). Nous verrons que dans certain cas, une étape appelée artériogénèse se produit, permettant de maintenir et renforcer des vaisseaux sanguins au devenir artériels.

VASCULOGENÈSE



ANGIOGENÈSE

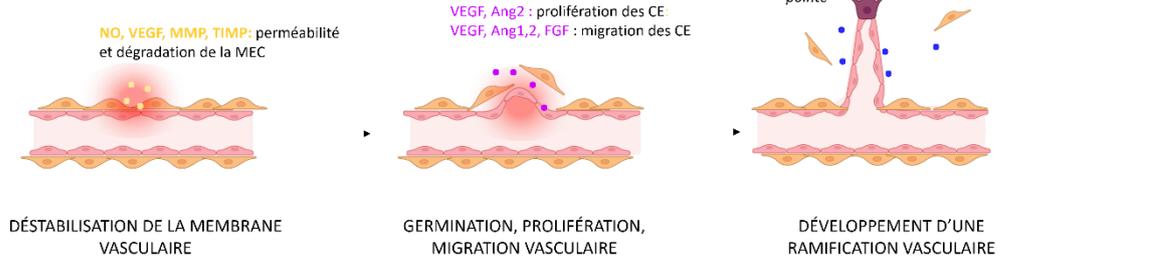


Figure 2 Représentation schématique de la néovascularisation. Deux mécanismes participent à ce processus : la vasculogénèse avec le développement d’un réseau vasculaire primitif qui se stabilise avec le recrutement de péricytes ; puis l’angiogénèse avec le développement de ramifications vasculaires grâce à la déstabilisation de la membrane vasculaire et à la migration des cellules endothéliales de pointe à travers la matrice extracellulaire.

i. Vasculogénèse : formation d’un réseau primitif

Le processus de vasculogénèse définit la formation *de novo* de vaisseaux sanguins au cours de l’embryogénèse^{18,19,22}. Les vaisseaux sanguins étant impliqués dans le transport de l’oxygène et des nutriments ainsi que dans l’élimination des déchets, le premier système organique fonctionnel à être développé durant l’embryogénèse est, le système cardiovasculaire. Durant la vasculogénèse, ce sont des cellules souches précurseurs vasculaires embryonnaires, aussi appelées angioblastes, qui vont migrer du mésoderme et former des îlots sanguins. C’est au sein de ces structures que les angioblastes vont se regrouper et se différencier en cellules progénitrices endothéliales (CPE) sous l’action de différents facteurs notamment le VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) et le bFGF (*basic Fibroblast Growth Factor*). Ces CPE vont par la suite commencer à s’organiser en réseaux tubulaires et ainsi développer des capillaires primitifs²³.

Chez l’adulte, la vasculogénèse a lieu lors de la cicatrisation des tissus ou bien lors du développement tumoral. La vasculogénèse conduit donc à la formation d’un système

vasculaire qui reste cependant instable et immature. Ce processus est alors complété par un autre phénomène : l'angiogenèse.

ii. Angiogenèse : germination et remodelage

Le processus d'angiogenèse définit la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux sanguins déjà existants^{18,24,25}. L'angiogenèse est favorisée par un manque d'oxygène et de nutriments à l'intérieur des tissus et initie alors les cellules endothéliales à quitter leur mode « stable » pour proliférer et migrer jusqu'aux sites hypoxiques en développement des nouveaux vaisseaux sanguins permettant ainsi d'approvisionner le tissu jusqu'à ce que des niveaux en oxygène et nutriments soient suffisants. Les cellules endothéliales deviennent alors quiescentes. Les facteurs de croissance jouent un rôle primordial durant l'angiogenèse. Ils permettent l'initiation, la régulation et le remodelage des vaisseaux sanguins. Le VEGF, bFGF et PDGF (ou CD31) sont les principaux facteurs de croissance impliqués dans ce processus. Le VEGF est produit par de nombreuses cellules, est un puissant mitogène et joue un rôle chimiotactique pour les cellules endothéliales. Le bFGF participe à la prolifération, la migration et la différenciation des cellules endothéliales. Et le PDGF participe à la maturation et au remodelage du vaisseau sanguin²³.

Le processus d'angiogenèse peut s'établir selon deux modes : l'angiogenèse germinative selon laquelle les nouveaux vaisseaux se forment en germant à partir des vaisseaux préexistants, et l'angiogenèse non germinative selon laquelle les nouveaux vaisseaux sont formés en se séparant de l'origine. Lors de l'angiogenèse germinative, une déstabilisation du vaisseau est observée avec une dégradation protéolytique de la matrice du vaisseau qui va alors permettre d'initier la migration de la cellule endothéliale de pointe à travers la MEC environnante. Concernant l'angiogenèse non germinative, les cellules endothéliales prolifèrent à l'intérieur du vaisseau sanguin ce qui engendre une augmentation progressive de la taille de la lumière vasculaire qui va alors être divisée²⁶.

iii. Myogenèse vasculaire : recrutement des cellules murales

Une fois que les nouveaux vaisseaux sanguins sont formés durant l'angiogenèse, des cellules murales, jouant un rôle de soutien vasculaire, vont être recrutées. Le PDGF-BB est un des facteurs angiogéniques principaux participant à ce recrutement grâce à sa fonction chimiotactique pour les cellules musculaires lisses²⁷⁻³⁰.

iv. Artériogenèse : stabilisation vasculaire

Après le développement de nouveaux vaisseaux sanguins par angiogenèse, lorsque les cellules murales ont été recrutées, celles-ci vont alors permettre de stabiliser les vaisseaux sanguins en migrant le long du vaisseau sanguin, toujours sous l'influence du facteur angiogénique PDGF-BB³¹. Ces cellules murales vont permettre au vaisseau d'acquérir des propriétés viscoélastiques et vasomotrices en créant une gaine musculaire.

1.2.3. La contraction tissulaire

Lorsque le tissu de granulation a comblé la totalité de la lésion du tissu, environ 1 à 2 semaines après la création de la plaie, une contraction va avoir lieu permettant de rapprocher les bords de la lésion et diminuer ainsi sa surface¹³. Ce phénomène de contraction est expliqué par l'action des myofibroblastes et par la compaction des fibres de collagène synthétisées par ces myofibroblastes³².

En effet, les fibroblastes vont se différencier en myofibroblastes, cellules de type mésenchymateuse. Les myofibroblastes possèdent un cytosquelette de fibres de stress, appelées des filaments d'actine (α -SMA) et permettent la synthèse de matrice extracellulaire en abondance. Leur différenciation s'effectue lors de la migration des fibroblastes dans le tissu jusqu'à la zone à reconstruire. Les changements en composition et de mécanique environnementale permettent aux fibroblastes de se différencier en myofibroblastes. Ceux-ci néosynthétisent alors de la matrice extracellulaire, principalement du collagène de type III, composant principal du tissu de granulation. Les myofibroblastes, reliés aux fibres de collagène *via* des microfilaments cytoplasmiques (fibronexus), tracteraient ces fibres pour les déposer les unes à côté des autres et leurs permettre de s'aligner et s'organiser en fibres plus épaisses³³. Ce phénomène de traction par les myofibroblastes serait à l'origine de cette rétractation tissulaire.

1.3. Le remodelage tissulaire

La dernière étape de formation d'un nouveau tissu correspond au remodelage tissulaire c'est-à-dire la formation d'un tissu conjonctif mature. Lorsque le tissu de granulation a été formé

et que le tissu a subi une rétractation due à l'organisation des fibres de collagène, environ 3 à 6 semaines après la création de la lésion, ce tissu va pouvoir se remodeler¹³. Ce sont les fibroblastes mais majoritairement la présence d'enzymes protéolytiques telles que les métalloprotéases et leurs inhibiteurs les TIMP, qui vont être à l'origine de cette étape³⁴. En effet les fibroblastes vont remplacer le tissu de granulation par un tissu conjonctif de type néoderme, moins rigide et plus élastique grâce à la dégradation des fibres de collagène de type III et la synthèse de fibres de collagène de type I. Enfin, de l'élastine, absente totalement du tissu de granulation, est synthétisée lors du remodelage tissulaire pour fournir l'élasticité au nouveau tissu³⁵. A la fin du remodelage tissulaire, le nombre de cellules diminue fortement par apoptose, aussi bien les cellules endothéliales que les myofibroblastes. Physiologiquement, ce processus de remodelage est une étape longue qui se compte en mois voir en années.

Pour recréer un tissu *via* des procédés de biofabrications *in vitro*, il est important de connaître avant tout la structure et la physiologie exacte des structures le composant, en particulier la structure des vaisseaux sanguins, sans quoi un tissu ne serait pas viable. Nous décrirons par la suite les différentes cellules à l'origine de ces processus de néovascularisation et de synthèse matricielle.

II. Structure et physiologie du vaisseau sanguin

L'ingénierie du tissu vasculaire a un potentiel important pour avoir un impact majeur sur un large éventail de problèmes cliniques et doit donc traduire les connaissances toujours croissantes de la biologie vasculaire pour développer de nouvelles options thérapeutiques³⁶⁻³⁸.

La plupart des tissus du corps humain dépendent des vaisseaux sanguins pour leur fournir les nutriments et l'oxygène nécessaires et en éloigner les déchets. Ils doivent résister à différentes pressions et contraintes de cisaillement, réguler le flux sanguin et la perméabilité, résister aux thromboses, et ils jouent un rôle majeur dans les réponses immunologiques³⁹.

Le tissu vasculaire réunit : (i) la macrovascularisation, avec des vaisseaux sanguins de diamètres supérieurs à 6 mm, (ii) les petits vaisseaux sanguins avec des diamètres compris entre 1 et 6 mm et (iii) la microvascularisation avec des vaisseaux sanguins aux diamètres inférieurs à 1 mm⁴⁰. En ingénierie tissulaire, la biofabrication de ces types de vaisseaux est primordiale, cependant leurs applications sont bien différentes. En effet, les macrovaisseaux et petits vaisseaux sont principalement utilisés en ingénierie tissulaire pour le remplacement de vaisseaux sanguins endommagés ou occlus, chez des patients⁴¹. Cependant les greffons actuels continuent de présenter un certain nombre de défauts avec notamment un faible taux de perméabilité, un manque de personnalisation du greffon lors de son implantation chez les populations pédiatriques nécessitant des interventions répétées, et les nombreuses infections à la suite de ces greffes.

De leur côté, les microvaisseaux sont essentiels pour le développement et la viabilité de tissus et organes, notamment de grande échelle, lors des transplantations. En effet, la microvascularisation s'est révélée être une étape critique pendant la régénération et la cicatrisation des plaies où un retard de perfusion vasculaire de la plaie ou du tissu implanté par le système vasculaire du patient, ralentit considérablement la formation de tissu de granulation, pouvant entraîner une infection^{42,43}. Le développement de tissu épais vascularisé *in vitro* est alors un enjeu crucial pour l'ingénierie des tissus et organes transplantables.

Dans un premier temps, afin de concevoir des tissus vasculaires pertinents, il est important de prendre en compte les composants structurels d'un vaisseau sanguin, car la compréhension de ces éléments est nécessaire pour la conception rationnelle de biomatériaux et le choix d'une source cellulaire appropriée.

II.1. Le réseau vasculaire

Les vaisseaux sanguins sont des conduits qui transportent le sang dans l'organisme. Ils représentent l'un des tissus les plus importants car ils sont largement présents dans chacun des organes du corps humain. Les vaisseaux sanguins possèdent la caractéristique d'être formés d'un passage creux à travers lequel circule le sang, connu sous le nom de lumière⁴⁴. Nous dénombrons trois grandes classes de vaisseaux sanguins qui se distinguent par leur structure et leur rôle (Figure 3) : les artères et artérioles, qui transportent le sang oxygéné du cœur vers les organes ; les capillaires, qui assurent la diffusion de l'oxygène et des nutriments

entre le sang et le tissu ainsi que l'élimination des déchets cellulaires et du dioxyde de carbone des tissus vers le sang ; les veinules et veines, qui transportent le sang chargé en gaz carbonique des organes vers le cœur. L'ensemble de ces trois classes forme le réseau vasculaire⁴⁰.

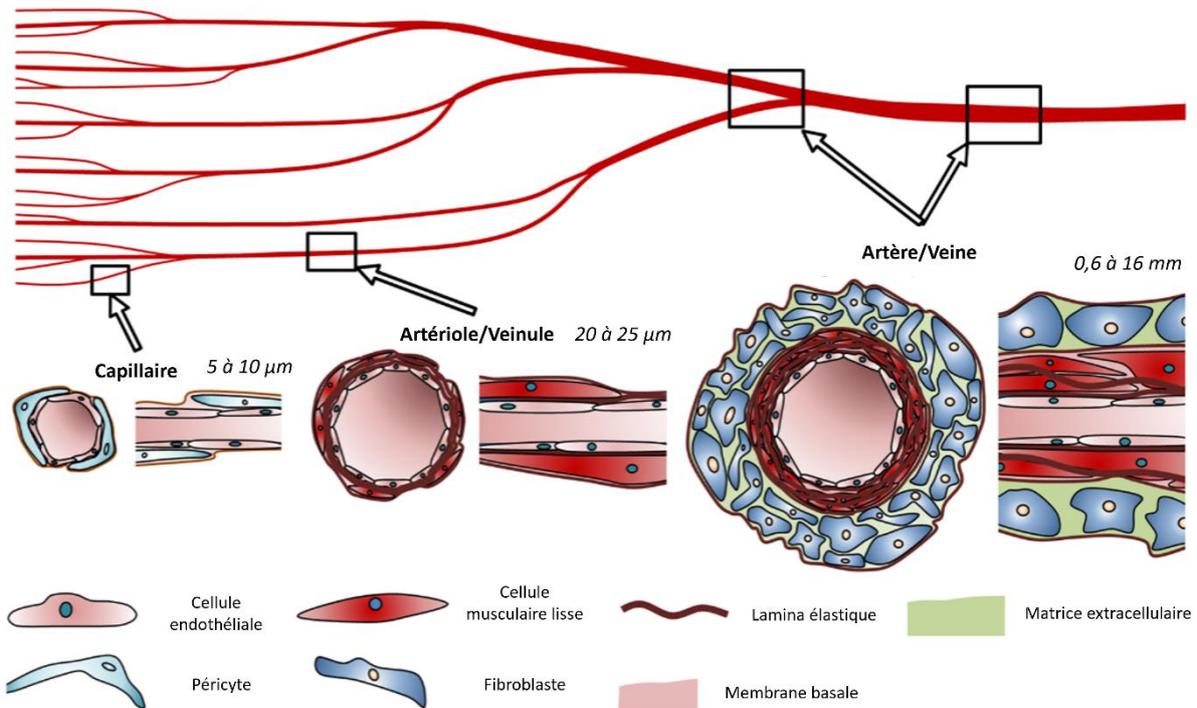


Figure 3 Représentation schématique de l'organisation du réseau vasculaire du corps humain. Un réseau hiérarchique est composé des artères et veines (entre 0,6 et 16 mm de diamètre) puis des artérioles et veinules (entre 20 et 25 µm) et enfin des capillaires (entre 5 et 10 µm). Traduite de⁴⁵

II.2. Artères et veines

II.2.1. Physiologie

Les artères et les veines sont des vaisseaux sanguins à paroi épaisse, souple et élastique, qui transportent le sang du cœur vers les organes ou assurent le drainage du sang chargé en CO₂ et des déchets métaboliques depuis les capillaires jusqu'au cœur, respectivement. Les artères assument les pressions artérielles les plus élevées dans le corps. Leur propriété élastique leur permettent de se rétrécir entre deux battements de cœur pour maintenir une pression artérielle constante. Cette pression artérielle est la force exercée par le sang sur les parois de ce vaisseau. De leur côté, les veines fonctionnent comme un réservoir qui varie en fonction du

volume sanguin, c'est-à-dire, si le corps subit une augmentation du volume sanguin, 98 % de ce volume sera absorbé par les veines 2 % sera absorbé par les artères.

Elles possèdent des diamètres compris entre 0,6 et 16 mm. Elles représentent donc les vaisseaux sanguins de plus gros calibres.

II.2.2. Histologie

La paroi des artères et des veines est semblable et se compose de trois couches distinctes, qui sont, de l'intérieur vers l'extérieur du vaisseau : l'*intima*, la *média* et l'*adventice*.

L'*intima*, couche interne de la paroi artérielle, est formée d'un endothélium et est séparée de la *media* par la limitante élastique interne (LEI)⁴⁶. C'est la couche la plus fine de la paroi artérielle. L'endothélium est formé par une monocouche de cellules endothéliales (CE) imbriquées les unes dans les autres grâce à la présence de desmosomes. Celles-ci vont former une barrière entre la lumière du vaisseau et la paroi du vaisseau⁴⁷. Les cellules endothéliales sont en contact direct avec le sang et jouent alors un rôle clé dans les processus biologiques tels que la coagulation, l'inflammation, la régulation du flux sanguin, la synthèse/dégradation des composants de la matrice extracellulaire^{48,49}. La limitante élastique interne est formée d'élastine et de collagène de type IV. Cette LEI est poreuse et présente différentes densités de pores en fonction des régions du réseau vasculaire⁵⁰. Ces pores permettent la diffusion des nutriments de la lumière du vaisseau vers les tissus sous-jacents de la paroi artérielle. Une des autres fonctions de cette LEI est liée à la résilience élastique de la paroi vasculaire afin de maintenir la pression artérielle.

La *media* est la couche centrale de la paroi artérielle. C'est la couche la plus épaisse. Elle est constituée essentiellement de cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV) et de collagène de type I et de type II⁵¹. Ces CMLV sont organisées en couches concentriques définies comme des unités lamellaires. Elles possèdent un phénotype contractile qui permet de réaliser une contraction ou une dilatation du vaisseau⁵¹⁻⁵³.

Enfin, l'*adventice*, la couche la plus externe à la paroi artérielle, est composée d'un tissu conjonctif peu organisé contenant des fibroblastes et des péricytes intégrés dans une matrice extracellulaire. L'*adventice* empêche le vaisseau de s'étendre ou de se rétracter excessivement. La présence de fibres de collagène de type I et de type III dans l'*adventice*, lui confère ces propriétés mécaniques de résistance à la traction⁵⁴. Dans les artères de gros

calibre, l'adventice et la media sont séparées par la limitante élastique externe, une couche acellulaire élastique.

II.3. Artérioles et veinules

II.3.1. Physiologie

Les artérioles et les veinules sont des ramifications des artères et des veines et assurent les mêmes fonctions que ces dernières. Cependant elles correspondent à des vaisseaux sanguins de plus petits calibres avec des diamètres compris entre 20 et 25 μm . En effet, la paroi n'est composée que de deux couches vasculaires.

II.3.2. Histologie

La paroi des veines et des artérioles est composée de deux couches distinctes. Une première couche interne, représentant l'endothélium grâce à l'organisation des cellules endothéliales en une monocouche continue. Et une seconde couche externe, composée d'une couche de cellules musculaires lisses. Cette paroi est moins épaisse que pour les artères et les veines du fait de la présence d'une pression moins importante par rapport à celle subit par les artères et les veines.

II.4. Capillaires

II.4.1. Physiologie

La dernière catégorie de vaisseaux sanguins du réseau vasculaire correspond aux capillaires. Ils représentent les plus petits vaisseaux sanguins avec un diamètre généralement compris entre 5 et 10 μm ⁴⁶. Ils font la transition entre les artérioles et les veinules en fermant la boucle du réseau de la circulation sanguine et en assurant la diffusion de l'oxygène et des nutriments entre le milieu vasculaire et les organes qu'ils traversent. Ils permettent aussi l'élimination des déchets métaboliques et du dioxyde de carbone des tissus vers le sang. Les capillaires sont agencés en réseaux arborescents que l'on appelle des lits capillaires. A l'intérieur de ces capillaires, le sang diffuse à des vitesses très faibles, permettant un temps suffisant pour réaliser les échanges.

II.4.2. Histologie

Les capillaires sont formés d'une paroi extrêmement fine d'environ 1 μm d'épaisseur⁴⁶. C'est grâce à cette paroi fine qu'une diffusion rapide et efficace de l'oxygène, des nutriments et des déchets, est possible. La paroi des capillaires est décrite habituellement par une couche, qui est composée de deux couches de types cellulaires différents : une couche de cellules endothéliales qui sont unies au niveau de leur bords par des jonctions anatomiques étanches appelés desmosomes, et une couche externe représentée par des péricytes, enrobant la totalité des cellules endothéliales pour permettre un maintien de la structure⁵⁵.

III. Les cellules vasculaires

Avoir une bonne compréhension de la structure et de la physiologie du réseau vasculaire ainsi que des processus de vasculogénèse et d'angiogénèse *in vivo*, permet d'avoir une vision plus approfondie des différentes cellules impliquées dans le développement d'un tissu vasculaire. Il paraît alors évident que le choix de ces cellules va influencer l'ingénierie cellulaire, de même que le choix des biomatériaux qui leur seront associés. Nous allons ainsi détailler la structure et la fonction de chacune des cellules impliquées ainsi que les moyens de culture et les communications qu'elles établissent entre elles pour auto-organiser en un tissu vasculaire.

III.1. Les cellules endothéliales

III.1.1. Structure

Les cellules endothéliales (CE) sont des cellules polarisées : leur face luminale est directement exposée aux constituants sanguins et aux cellules en circulation, leur face basale est ancrée dans la matrice extracellulaire (MEC) composée de protéines adhésives (Figure 4). La forme des cellules endothéliales varie en fonction de leur position dans l'arbre vasculaire mais généralement elles possèdent une forme aplatie polygonale, d'environ 30 à 50 μm de longueur, 10 à 15 μm de largeur et 0,1 à 10 μm d'épaisseur. Les CE sont orientées le long du vaisseau sanguin, dans le sens du flux sanguin afin de minimiser la contrainte de cisaillement exercée sur elles par le sang qui s'écoule⁵⁶. Les monocouches de CE de l'endothélium

présentent un motif de galets caractéristique. L'intégrité de cette monocouche est assurée par des systèmes d'adhérence cellule/cellule (desmosomes) et cellule/matrice (hémidesmosomes). Pour l'adhésion des CE à la matrice, des protéines de la MEC vont interagir directement avec des récepteurs de la famille des intégrines, présents à la surface des CE. Pour l'adhésion cellule/cellule, cela est mis en place grâce à des molécules d'adhésion comme les intégrines, les cadhérines et les PECAM-1 (*Platelet Endothelial Cell Adhesive Molecule-1*).

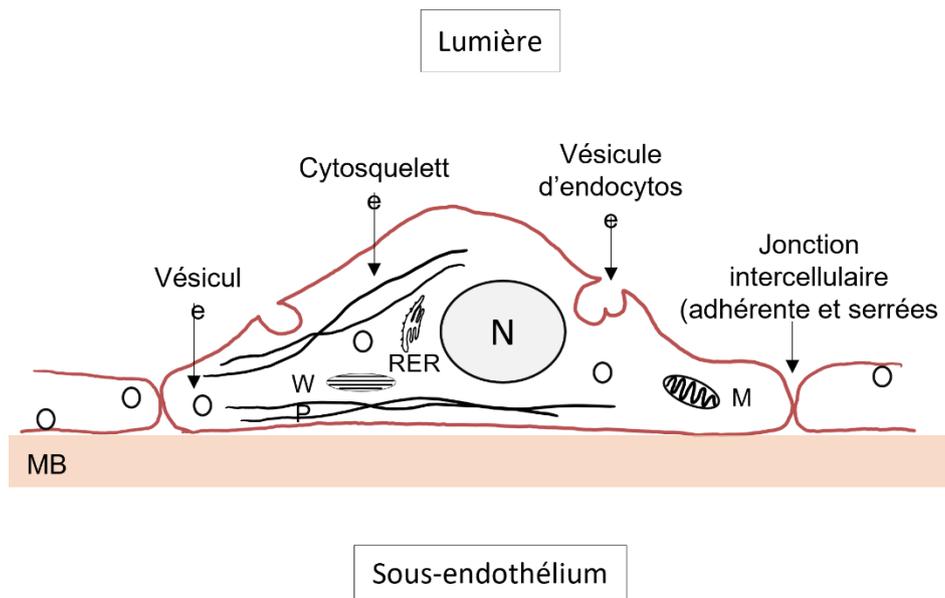


Figure 4 Représentation schématique de la cellule endothéliale, constituant l'endothélium. Les cellules endothéliales sont ancrées dans une membrane basale et forment une couche imperméable *via* des jonctions intercellulaires (adhérentes et serrées). N : noyau ; RER : Réticulum endoplasmique rugueux ; WP : corps de Weibel Palade ; M : mitochondrie ; MB : membrane basale.

III.1.2. Fonctions

Les CE sont hétérogènes et fonctionnent distinctement en fonction des organes et de la partie de l'arbre vasculaire qu'elles constituent⁵⁷. Jusqu'au début des années 1970, cette monocouche de cellules endothéliales était considérée comme une unique barrière inerte séparant les cellules du sang et les tissus environnants. Les recherches plus poussées sur ces cellules ont montré de toute évidence des fonctions bien plus importantes⁵⁸⁻⁶⁰.

Tout d'abord elles jouent un rôle majeur dans la perméabilité⁵⁶. Les CE forment une monocouche représentant une barrière de perméabilité sélective qui permet une régulation et un échange de molécules (eau, protéines, ions...) entre le sang et les tissus. La fonction de

barrière endothéliale et la perméabilité vasculaire sont régies par les jonctions intercellulaires qui sont de deux types : adhérentes et serrées^{61,62}. L'ouverture de ces jonctions et la formation d'espaces entre les CE, sous l'action de médiateur circulants dans le sang telles que des cytokines, permet le passage de molécules.

Ensuite, les CE ont une fonction vital anti-thrombosante⁵⁶. La surface en contact avec le flux sanguin possède une action de thromborésistance qui va permettre d'empêcher la coagulation à l'intérieur des vaisseaux sanguins. Les CE expriment à leur surface une protéine membranaire intégrale : la thrombomoduline, aussi connu sous le nom de CD141, qui est un récepteur de la thrombine. CD141 réduit la coagulation sanguine en transformant la thrombine, enzyme pro-coagulante, en une enzyme anti-coagulante.

Enfin, les CE possèdent des fonctions de vasomotricité⁵⁶. Elles permettent de moduler le tonus vasculaire donc le débit sanguin, en coordination avec les cellules musculaires lisses vasculaires. En réponse à un effet mécanique d'étirement de la paroi du vaisseau sanguin, les CE vont sécréter des agents vasoconstricteurs comme, l'endothéline-1 et l'angiotensine II et de vasodilatateurs comme la prostacycline, la bradykinine et le monoxyde d'azote (NO). Ces agents vont agir directement sur les cellules musculaires lisses sous-jacentes, en inhibant ou en stimulant leur croissance.

III.1.3. Histochimie et cytochimie

Les cellules endothéliales sont généralement observées aussi bien en immunohistochimie qu'en immunofluorescence. Les principaux marqueurs utilisés sont ceux de la famille des CD (Cluster de Différenciation). Ce sont des glycoprotéines membranaires qui peuvent agir de plusieurs manières, souvent comme récepteurs, molécules d'adhésion, enzymes ou ligands importants pour la cellule.

Pour en citer quelques uns, le marquage du CD31 (ou PECAM1 pour *Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule*) est généralement utilisé. C'est une protéine d'adhésion transmembranaire fortement exprimée sur les cellules endothéliales. Le marquage de la VE-cadhérine, ou CD144, est aussi largement utilisé⁶³. C'est une molécule d'adhésion endothéliale spécifique des jonctions intercellulaires entre les CE. Cette adhésion modérée par la VE-cadhérine est importante pour le contrôle de la perméabilité vasculaire. Elle participe de plus à la prolifération cellulaire, à l'apoptose et module les fonctions des récepteurs du facteur de croissance endothélial vasculaire. Enfin, le marquage du vWF (facteur de von Willeband) peut

être réalisé⁶⁴. Le vWF est une glycoprotéine participant à la coagulation sanguine. Il est libéré des corps de Weibel-Palade (WPB) des CE et participe à la régulation de l'angiogenèse.

III.2. Les cellules musculaires lisses vasculaires

III.2.1. Structure

Les cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV) sont les cellules de la *media* des vaisseaux sanguins. Elles sont généralement fusiformes avec des extrémités pointues. Elles possèdent un diamètre compris entre 2 et 5 μm et une longueur très variable en fonction du tissu, allant de 15 (petits vaisseaux sanguins) à 500 μm (utérus). Elles sont organisées de manière parallèle les unes par rapport aux autres et forment des feuillets cellulaires^{46,65} (Figure 5).

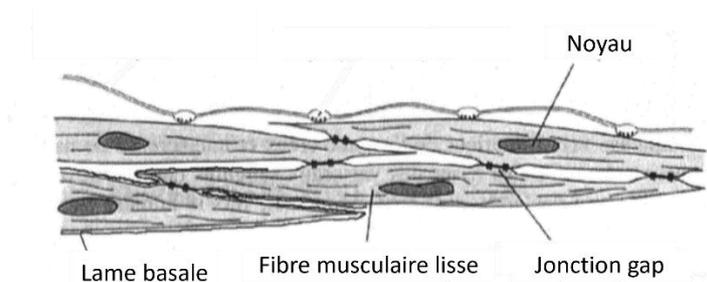


Figure 5 Représentation schématique de cellules musculaires lisses organisées en feuillets parallèle les unes par rapport aux autres⁶⁶

III.2.2. Fonctions

Contrairement aux cardiomyocytes ou aux cellules musculaires striées, les CMLV ne sont pas à leur dernier stade de différenciation et possèdent une plasticité en fonction des stimuli. Les CMLV possèdent deux phénotypes bien distincts : le phénotype contractile et le phénotype synthétique^{46,67} (Figure 6). Dans les conditions physiologiques, les CMLV présentent un phénotype contractile et expriment des protéines du cytosquelette telles que la vimentine, la gelsoline, la vinculine, l'actine musculaire lisse (α -SMA) et la chaîne lourde de myosine des muscles lisses (SM-MHC). Lorsque les CMLV expriment le phénotype synthétique, elles prolifèrent, migrent, synthétisent de la matrice extracellulaire et perdent une majeure partie des marqueurs de différenciation contractile. Cette dichotomie phénotypique n'est pas fixe et

peut changer au cours du temps. Les CMLV peuvent passer du phénotype synthétique au phénotype contractile et inversement suivant un processus dynamique complexe dépend des ions Ca^{2+} 68,69.

Dans les vaisseaux sanguins, la fonction principale des CMLV est d'assurer un tonus vasculaire pour maintenir une pression artérielle systémique. Au contraire, lors de la brèche d'un vaisseau sanguin, les CMLV vont être capables de proliférer et de migrer pour réparer cette brèche. Une fois la plaie réparée, une partie des CMLV entrent en apoptose et permettent une régulation de l'homéostasie de la paroi vasculaire.

Enfin, une autre fonction importante des CMLV est d'assurer le maintien de la matrice-extracellulaire grâce à des mécanismes d'action agissant contre la dégradation par les métalloprotéases (MMP-2, MMP-9, MMP-7 ou MMP-13). Elles possèdent aussi la capacité à sécréter du collagène de type I, de l'élastine et de reformer de la matrice⁷⁰.

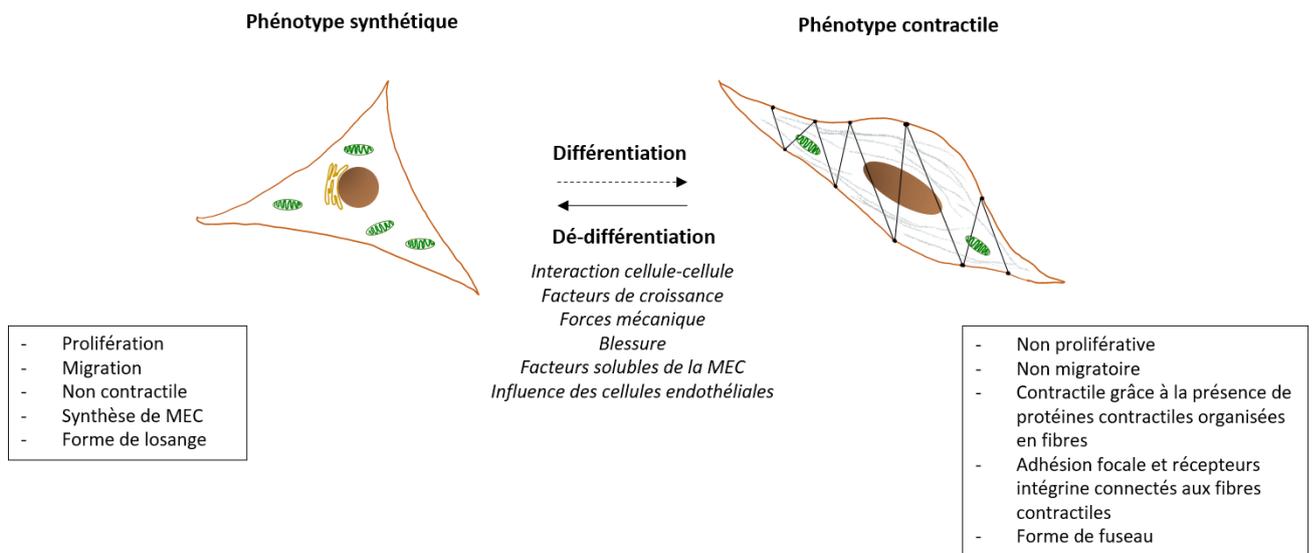


Figure 6 Représentation schématique de la cellule musculaire lisse vasculaire selon ses deux phénotypes. Le phénotype synthétique représenté par la cellule sous forme de losange et le phénotype contractile représenté par la cellule sous forme de fuseau.

III.2.3. Histochimie et cytochimie

Les marqueurs les plus couramment utilisés pour observer les cellules musculaires lisses vasculaires sur des coupes histologiques sont le marquage de l' α -SMA, mais aussi le marquage des isoformes de la chaîne lourde de myosine musculaire lisse (SM-MHC : SM1 et SM2)⁷¹.

L'expression de cette dernière est strictement limitée aux cellules musculaires lisses vasculaires totalement différenciées et permet donc leur identification, contrairement à l' α -SMA qui est exprimé par les SMC dès le stade précoce du développement. Lorsqu'un profil α -SMA (+) /SM-MHC (+) est identifié, nous pouvons parler de cellules musculaires lisses différenciées alors que le profil α -SMA (+) /SM-MHC (-) indique un profil indifférencié.

III.3. Les fibroblastes

III.3.1. Structure

Les fibroblastes représentent le type cellulaire le plus abondant du tissu conjonctif. Ils forment la charpente de base pour les tissus et organes. Bien que ces cellules soient retrouvées dans plusieurs systèmes d'organes, leur morphologie reste la même⁷². Les fibroblastes possèdent une origine mésenchymateuse et sont de forme allongée en fuseau ou en étoile avec une multitude de projections cytoplasmiques. Les fibroblastes actifs se reconnaissent à leur abondance de réticulum endoplasmique rugueux (RER) ainsi qu'un grand appareil de Golgi étendu. Les fibroblastes inactifs (fibrocytes), sont de taille plus petite et possèdent une quantité plus faible de RER. Lorsqu'ils sont activés en 2D, les fibroblastes sont organisés en amas parallèles.

III.3.2. Fonctions

Les fibroblastes possèdent une variété de fonctions. Sous homéostasie, ils sont responsables du maintien de la matrice extracellulaire (MEC). Quand ils subissent un stress, ils vont s'adapter à leur environnement et possèdent la capacité de répondre et de sécréter des signaux locaux. En effet, lorsqu'un phénomène de blessure intervient, les fibroblastes vont synthétiser des éléments constitutifs nécessaires pour remplacer et remodeler le tissu endommagé⁷³.

Les fibroblastes peuvent produire un groupe vaste de protéines telles que le collagène de type I, III et IV, des protéoglycanes, des glycosaminoglycanes, des métalloprotéases, de la fibronectine. Chez l'adulte, les fibroblastes restent principalement sous forme quiescente. Les fibroblastes quiescents maintiennent l'intégrité de la matrice extracellulaire *via* un processus

de dégradation et de synthèse activés et régulés grâce à des cytokines pro-inflammatoires et des facteurs de croissance (TGF α , TGF β , PDGF, EGF, TNF α)⁷⁴.

Les fibroblastes peuvent aussi avoir différents rôles en fonction de leur localisation à l'intérieur d'un même tissu/organe. Généralement, les fibroblastes localisés superficiellement sont responsables de la re-épithélialisation lors de la cicatrisation des plaies alors que les fibroblastes situés plus en profondeur dans le tissu sont responsables de la génération de la matrice extracellulaire⁷⁵. Contrairement aux cellules épithéliales et endothéliales, les fibroblastes ne forment pas de monocouche plate et ne sont pas limités par une fixation polarisante à une lame basale.

Les fibroblastes ont la capacité de se transformer en raison de la grande variété des récepteurs d'adhésion présents à leur surface (intégrines, syndécans, cadhérines) qui permettent une grande communication entre la cellule et son environnement⁷⁶. L'une des principales transformations est celle menant au phénotype myofibroblastes^{32,77,78} (Figure 7). Lorsqu'un stress élevé dans le tissu est ressenti, les fibroblastes subissent un changement phénotypique de leur état normal quiescent au cours duquel ils permettent un renouvellement lent de la MEC, à un phénotype prolifératif et contractile, celui des myofibroblastes. Cette différenciation est aussi stimulée par la présence de TGF- β 1, libéré par un grand nombre de cellules telles que les cellules inflammatoires et les plaquettes⁷⁹. La production d'actine musculaire lisse ainsi que la présence de métalloprotéase 2, sont les principales caractéristiques de ce changement. Ces myofibroblastes sont les acteurs clés du maintien de l'homéostasie et de la réparation tissulaire. Ils sont intégrés dans une MEC organisée qu'ils sécrètent en mettant en place un dialogue complexe et interactif avec ce micro-environnement. Grâce à la sécrétion de métalloprotéases matricielles et d'inhibiteurs tissulaires des métalloprotéases, les myofibroblastes sont capables de remodeler rapidement le tissu. Les myofibroblastes vont travailler en conjonction avec les cellules endothéliales vasculaires pour former un tissu de granulation pendant les périodes de cicatrisation³². Lorsque la réparation et le remodelage tissulaire sont terminés, les myofibroblastes entrent en apoptose.

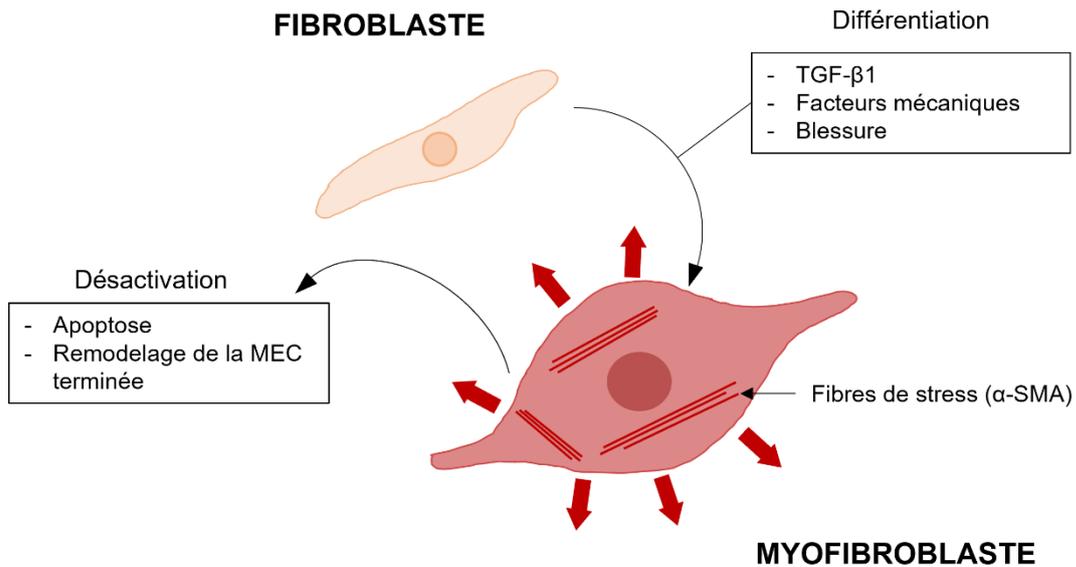


Figure 7 Représentation schématique du fibroblaste et de son phénotype myofibroblastique. Le fibroblaste possède une forme de fuseau alors que le myofibroblaste est plus arrondi. La différenciation en myofibroblaste est dû à la présence de stress mécanique et du facteur soluble TGF β 1 synthétisé par les cellules inflammatoires. La caractéristique majeure différenciant les deux phénotypes est la présence de fibres de stress contenant de l'actine musculaire lisse α chez le myofibroblaste. Le myofibroblaste disparaît ensuite par apoptose à la fin du remodelage tissulaire.

III.3.3. Histochimie et cytochimie

Concernant les fibroblastes, les colorations histochimiques n'ont pas un grand succès car il n'existe pas de marqueur spécifique des fibroblastes. Pour réussir à les distinguer dans un tissu, il faut réaliser plusieurs colorations chevauchantes des autres types cellulaires présents dans le tissu et les identifier par absence de marquage.

La technique d'immunofluorescence (IF) s'est révélée plus efficace. Elle permet notamment de comparer la présence de fibroblastes ou de myofibroblastes grâce à l'expression de l'actine musculaire lisse α , qui est un type d'actine présent uniquement dans les myofibroblastes et absent dans les fibroblastes. Cependant, lors de l'utilisation en coculture avec un autre type cellulaire exprimant des filaments d'actine, comme les CMLV, la distinction entre les deux sera complexe.

III.4. Les péricytes

III.4.1. Structure

Les péricytes sont des cellules périvasculaires enveloppant la surface du vaisseau sanguin. Elles sont aussi connues sous le nom de « cellules de Rouget », en rapport avec le chercheur Charles-Marie Benjamin Rouget qui les décrit en 1873⁸⁰, deux ans après leur découverte en 1871 par Eberth⁸¹.

Il est important de noter que les péricytes ont une ontogénèse complexe car ils peuvent se développer à partir de multiples cellules en fonction de leur localisation dans l'embryon. Le processus le plus décrit à ce jour est leur développement à partir de cellules souches mésenchymateuses⁸². Cependant, il a été montré que les péricytes peuvent aussi se développer à partir de la crête neuronale du cerveau antérieur⁸³.

Les péricytes possèdent un corps cellulaire avec un noyau proéminent, un contenu cytoplasmique réduit ainsi que plusieurs prolongements cytoplasmiques entourant une ou plusieurs cellules endothéliales. Les péricytes sont intégrés dans une membrane basale en continuité avec la membrane basale des cellules endothéliales⁸⁴⁻⁸⁷.

Un point très caractéristique de la présence de péricytes autour des vaisseaux sanguins est la présence de jonctions « peg-and-socket » qui ont la forme d'interdigitations entre la membrane plasmique de la cellule endothéliale et la membrane plasmique du péricyte. Ces cellules communiquent donc par contact physique direct et par voie de signalisation paracrine. Ces jonctions permettent un échange d'ions et de petites molécules.

III.4.2. Fonctions

Lors du développement des vaisseaux sanguins, la dernière étape consiste en une stabilisation de ces vaisseaux sanguins. Pour réaliser cette étape, des péricytes et des cellules musculaires lisses sont recrutées par les cellules endothéliales *via* la sécrétion de PDGF β , pour permettre un maintien des vaisseaux sanguins ainsi créés (Figure 8). Le développement de nouveaux vaisseaux sanguins, communément appelée l'étape d'angiogenèse, peut ensuite avoir lieu si une nécessité de vascularisation est ressentie dans le tissu. Les péricytes vont alors recevoir un signal extracellulaire, général du à l'hypoxie du tissu par la sécrétion de monoxyde d'azote (NO), vont alors se détacher du vaisseau sanguin, entraînant une perméabilité vasculaire, une

prolifération des cellules endothéliales et la création d'un nouveau vaisseau sanguin. Ce nouveau vaisseau va alors recruter des péricytes pour se stabiliser. Le processus est ainsi reproduit.

Outre la fonction de stabilisation des vaisseaux sanguins, les recherches ont montré que les péricytes sont associés à d'autres fonctions. Ils peuvent notamment détecter les stimuli angiogéniques et même servir de guide pour les tubes en germination. Enfin, tout comme les cellules musculaires lisses vasculaires, les péricytes permettent de gérer les dilatations ou les contractions des vaisseaux sanguins. Cela a notamment été prouvé lors de l'identification d' α -SMA, protéine contractile, à l'intérieur des péricytes.

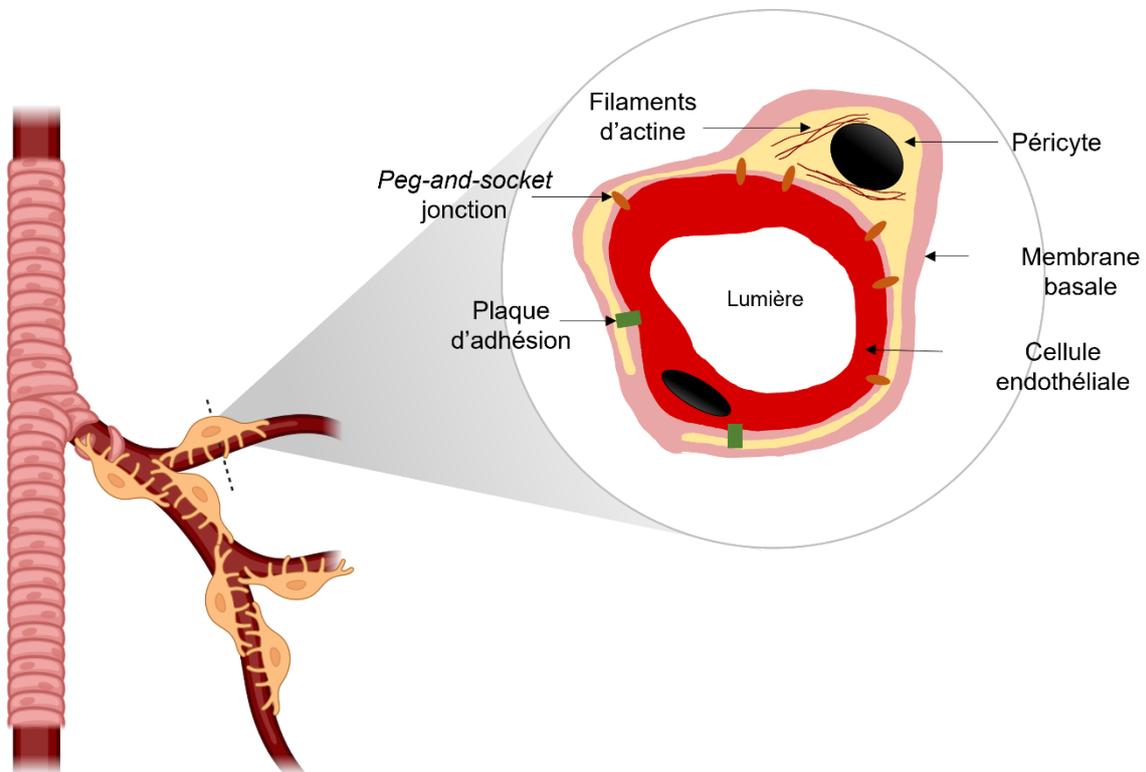


Figure 8 Représentation schématique de l'ultrastructure d'un péricyte et de son interaction avec la cellule endothéliale. Le péricyte possède un noyau discoïde entouré d'une petite quantité de cytoplasme. Il possède des filaments d'actine. Le péricyte s'enroule autour de la cellule endothéliale. Les péricytes et les cellules endothéliales sont séparés par une membrane basale mais elles rentrent en interaction *via* des jonctions caractéristiques « *peg-and-socket* » et à l'aide de plaques d'adhésion.

III.4.3. Histochimie et cytochimie

Il est admis que les péricytes appartiennent à la même lignée et catégorie de cellules que les cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV), et il n'existe pas de marqueur moléculaire

spécifique connu qui puisse permettre d'identifier sans équivoque les péricytes et les distinguer des CMLV ou autres cellules mésenchymateuses.

L'identification des péricytes dans des coupes histologiques se fait régulièrement par déduction morphologique (protubérances formées par les péricytes liés aux cellules endothéliales) ainsi que par des contre marquages permettant d'identifier les cellules endothéliales et les marqueurs de péricytes, au même endroit. En immunofluorescence, le récepteur du facteur de croissance PDGF-R β et du protéoglycane NG2, qui est un cofacteur du PDGF, sont souvent utilisés. Les péricytes peuvent aussi être identifiés grâce à l'expression de l'actine musculaire lisse alpha. Cependant, une fois de plus, lors d'une coculture avec un autre type cellulaire exprimant l'actine musculaire lisse, comme les CMLV, la différenciation entre les deux ne sera possible que par différenciation morphologique.

Les différents types cellulaires que nous venons de décrire, élaborent des communications entre elles afin de recréer, de remodeler un tissu. Cependant, l'utilisation de ces cellules dans un modèle d'ingénierie tissulaire nécessite d'établir un certain nombre de paramètres de culture.

III.5. Le système d'interaction cellulaire complexe

III.5.1. La co-culture

L'ingénierie tissulaire vasculaire implique généralement le développement de systèmes de co-culture cellulaires. En effet, de nombreux facteurs angiogéniques, permettant la prolifération, la migration et l'organisation des cellules endothéliales en un réseau vasculaire, ne sont pas sécrétés par ces cellules endothéliales elles-mêmes. C'est pourquoi des systèmes de co-culture de cellules endothéliales avec des cellules stromales, sont nécessaires. Dans la majorité des études, les cellules endothéliales sont placées en co-culture avec des fibroblastes, des péricytes, des cellules souches mésenchymateuses ou encore des cellules musculaires lisses^{28,88-94}.

L'organisation cellulaire est contrôlée par une diaphonie entre ces cellules stromales de soutiens et les cellules endothéliales grâce à la sécrétion de facteurs solubles dans le micro-

environnement ou *via* des contacts directs cellule-cellule²⁸. Ces systèmes de co-culture sont utilisés en macrovascularisation principalement pour reproduire la composition cellulaire de la paroi vasculaire avec l'observation du recouvrement d'un tube cylindrique par les cellules endothéliales, sans se focaliser sur les interactions entre ces cellules à travers les différentes couches. Au contraire dans l'ingénierie microvasculaire, ces communications cellulaires sont essentielles pour le développement réussi de ce tissu. Il existe principalement deux modèles de cultures pour étudier le développement de microvascularisation : la co-culture 2D et la co-culture 3D. Durant de nombreuses années les chercheurs étudiaient l'organisation et les interactions cellulaires à travers des mono et co-culture de cellules endothéliales et cellules stromales. Cependant ces modèles ne mimait finalement pas l'architecture tissulaire vasculaire ainsi que les conditions physiologiques retrouvées *in vivo*. Au contraire, les systèmes de co-culture 3D permettent de mieux représenter ces interactions hétérotypiques cellule-cellule et cellule-matrice⁹⁵. En effet, comme nous l'avons décrit pour les techniques de biofabrications microvasculaires, les cellules peuvent êtreensemencées dans des échafaudages de type hydrogel, ensemencées directement dans des micro-canaux ou encore bioimprimées pour créer une forme contrôlée et spécifique au tissu à reformer.

Le choix du modèle de co-culture 3D permet ainsi de mieux représenter les communications cellulaires. Les cellules endothéliales sont alors souvent cultivées avec les fibroblastes. Ces dernières permettent de sécréter des facteurs angiogéniques nécessaires à la prolifération, la migration et surtout à l'organisation endothéliale que nous décrivons par la suite⁹⁶. Les fibroblastes jouent aussi un rôle majeur dans la stabilité de la structure tissulaire 3D en néosynthétisant de la matrice extracellulaire. Ils permettent ainsi de créer un soutien aux cellules endothéliales en cours de migration et d'organisation⁹⁷. Dans leurs travaux, Costa-Almeida et al⁹⁸ décrivent en détail le rôle majeur des fibroblastes dans la régénération tissulaire et particulièrement dans la vascularisation.

III.5.2. Les conditions de culture

En ingénierie tissulaire vasculaire, un des défis est de trouver les conditions de culture optimales du tissu développé. En effet, l'utilisation de co-culture de 2 ou plus types cellulaires différents, l'utilisation d'hydrogels formés de plusieurs matériaux différents, stables, et mimant au mieux à la matrice extracellulaire, induisent forcément une sélection appropriée des conditions de culture comme le rapport d'ensemencement cellulaire, la densité cellulaire,

les techniques d'ensemencement avec le biomatériau, le choix du milieu de culture, avec ou sans suppléments, avec ou sans facteurs de croissance, etc⁹⁹⁻¹⁰¹. Cependant, à l'heure actuelle, aucun consensus n'existe sur les conditions de culture spécifiques, notamment lors de l'utilisation de systèmes de co-culture^{28,102}. En effet, pour trouver les conditions de culture optimales, le choix des biomatériaux et des types cellulaires sont à prendre en considération et est dépendant de chaque étude. Par exemple, pour les cellules endothéliales, des chercheurs ont privilégiés les milieux de culture complétés de facteurs angiogéniques (VEGF, FGF-2, EGF, IGF1)¹⁰³ alors que d'autres ont utilisé des milieux de culture complétés de facteurs de croissance (Hydrocortisone, L-glutamine, héparine, acide ascorbique)⁹⁹. Même si aucun accord n'est établi sur le choix des conditions de culture, il est cependant convenu que le type cellulaire le plus sensible aura généralement la priorité dans la formulation du milieu de culture final à utiliser. Un autre défi pour trouver les meilleures conditions de culture dans un système de co-culture, est le fait de trouver des conditions qui conviennent à un des types cellulaires mais affecte négativement l'autre type cellulaire. Cela est d'autant plus vrai pour le développement de systèmes microvasculaires. Des facteurs initiant la prolifération des cellules endothéliales pourraient inhiber celui des cellules stromales et inversement. Il convient donc de trouver le bon équilibre des conditions de culture du tissu à biofabriquer ainsi que ses objectifs, ses applications et les biomatériaux qui vont servir de support, afin d'optimiser et de standardiser ces conditions primordiales¹⁰¹.

III.5.3. La communication cellule-cellule

A l'intérieur des systèmes de co-culture mis en place, des communications vont s'établir entre les différents types cellulaires afin de développer un tissu fonctionnel. Ces communications peuvent être intercellulaires par un contact direct entre les cellules ou *via* des facteurs solubles de signalisation synthétisés par ces cellules.

i. Les cellules endothéliales et les fibroblastes

Les fibroblastes et les cellules endothéliales communiquent entre elles et ces communications sont essentielles au développement d'un tissu fonctionnel. Ces communications sont de type paracrine, impliquant des messagers chimiques qui agissent dans le voisinage de la cellule qui les a synthétisés (Figure 9).

Pour former de nouveaux vaisseaux sanguins, les cellules endothéliales doivent adhérer à la matrice extracellulaire *via* des intégrines et vont ensuite pouvoir proliférer et migrer. Néanmoins, la simple présence de cellules endothéliales n'est pas suffisante à la formation de vaisseaux sanguins. La présence des fibroblastes est nécessaire car ils soutiennent l'angiogenèse *via* le remodelage de la MEC et la libération de molécules de signalisation que nous allons décrire^{104,105}. Ainsi, le rôle des fibroblastes dans la fabrication d'un tissu vasculaire n'est pas à négliger.

Dans leurs travaux en 1991, Villashi et al. ont montré une survie prolongée des cellules endothéliales lorsqu'elles sont mises en co-culture *in vitro* avec les fibroblastes¹⁰⁶. Seules dans une matrice de collagène, les cellules endothéliales dégénèrent en 3-4 jours alors qu'en présence des fibroblastes, la formation de microvaisseau est possible et leur durée de vie prolongée de plusieurs semaines. Ils ont démontré que la formation des vaisseaux sanguins était stimulée à la fois par la présence de fibroblastes dans la matrice mais aussi grâce à la présence de milieu conditionné par les fibroblastes, ce qui démontre la stimulation cellulaire de manière paracrine. En effet, un milieu conditionné fait référence aux enzymes, facteurs de croissance, cytokines, hormones, sécrétés dans le milieu de culture par les cellules cultivées en 2D. Ce milieu conditionné peut être récolté et utilisé sur un autre type cellulaire pour induire des processus de croissance, de différenciation ou encore d'angiogenèse grâce aux facteurs solubles synthétisés par les cellules en 2D. Les auteurs ont alors démontré que les fibroblastes sécrètent plusieurs messagers chimiques qui vont influencer le développement de vaisseaux sanguins dont le VEGF, l'IL-8, le FGF-2, l'angiopoïétine-1 (Ang-1) et l'angiopoïétine-2 (Ang-2)¹⁰⁷⁻¹¹¹.

Le VEGF (*vascular endothelial growth factor*) est un facteur de croissance spécifique aux cellules endothéliales, qui va stimuler leurs fonctions de prolifération, de migration ainsi que l'angiogenèse et la libération de monoxyde d'azote (NO). Cette stimulation est réalisée grâce à la liaison du VEGF à des récepteurs membranaires des cellules endothéliales (Flt1 (VEGF-R1) et KDR (VEGF-R2/Flk-1)), qui conduit à l'activation de tyrosine kinases intrinsèques impliquées dans un certain nombre de voies de signalisation dans la cellule endothéliale. La fonction du récepteur KDR est plus connue que celle de Flt1 et il agirait sur la prolifération des CE *via* la voie de signalisation Ras/MAPK¹¹⁰.

Le facteur de croissance basique des fibroblastes, bFGF (*basic Fibroblast Growth Factor*) ou FGF-2, est quant à lui, un facteur de croissance à plus large spectre, c'est-à-dire qu'il ne cible pas essentiellement les cellules endothéliales. Concernant son rôle envers les cellules endothéliales, il serait impliqué dans le maintien de l'intégrité vasculaire en raison de sa capacité à soutenir les jonctions serrées entre les cellules endothéliales. Le FGF va activer cet effet dans la cellule endothéliale en se liant à des récepteurs de la surface cellulaire tels que FGFR1, FGFR2, FGFR3 et FGR4, et va conduire encore une fois à l'activation de tyrosine kinases. Lors de sa liaison au récepteur FGFR1 par exemple, les tyrosines kinases Src, PI3K ainsi que les voies de signalisation Ras/MAPK et PLC vont être activées^{108,112}.

Le VEGF et le FGF sont deux puissants facteurs de croissance angiogéniques. Cependant, des différences morphologiques de leur action sur les vaisseaux sanguins sont connues depuis longtemps. Le VEGF va induire l'angiogenèse de vaisseaux sanguins possédant des fenestrations alors que le FGF va induire l'angiogenèse de vaisseaux sanguins totalement hermétiques¹¹³. Le VEGF induit un désassemblage de la VE-cadhérine qui a pour fonction l'intégrité des jonctions intercellulaires et donc possède un rôle déterminant dans la perméabilité de l'endothélium. Le FGF permettrait donc de contre-balancer ce désassemblage pour maintenir l'hémostase vasculaire. Le bon équilibre FGF/VEGF joue donc un rôle important dans la régulation de la perméabilité des vaisseaux sanguins.

Les angiopoïétines, sécrétées soit par les cellules endothéliales pour une signalisation autocrine, ou soit par les cellules mésenchymateuses pour une signalisation paracrine, sont des facteurs de croissance impliqués directement dans l'angiogenèse des vaisseaux sanguins. Quatre angiopoïétines ont été identifiées à ce jour, mais les deux plus étudiés sont l'Ang-1 et l'Ang-2. L'Ang-1 est essentielle pour l'adhésion, la migration, la maturation et la survie des vaisseaux sanguins tandis que l'ang-2 favorise la mort cellulaire et perturbe la vascularisation. Ce sont tous les deux des ligands pour le récepteur de surface Tie-2 exprimé sur la cellule endothéliale. Ang-1 agit comme un agoniste de Tie-2 alors que Ang-2 agit comme un antagoniste de Tie-2. Lorsque Ang-1 se lie à Tie-2, il induit la migration et la survie des cellules endothéliales pour leur permettre de former des vaisseaux sanguins. Il a notamment été démontré que l'application de Ang-1 de manière exogène sur une plaie, améliorerait la vascularisation¹¹⁴. Cependant, il a été montré qu'en présence de VEGF, l'Ang-2 favorise la néovascularisation¹¹⁵.

L'interleukine-8 (IL-8) est une chimiokine CXC angiogénique produite principalement par les cellules épithéliales, les cellules musculaires lisses et les cellules endothéliales¹¹⁶. Elle a notamment été décrite comme étant un facteur angiogénique puissant¹¹¹. L'IL-8 et ses récepteurs CXCR1 et CXCR2 ont été observés à la surface des cellules endothéliales et joueraient un rôle cruciale dans la prolifération et la survie cellulaire en inhibant l'apoptose des cellules endothéliales¹¹⁷. De plus, l'IL-8 joue un rôle important dans la sécrétion de métalloprotéases telles que la MMP-2 et la MMP-9 ce qui signifie que l'IL-8 est impliquée dans la régulation de la dégradation de la matrice extracellulaire permettant ainsi aux cellules endothéliales de migrer, proliférer et s'organiser en structures tubulaires.

L'influence des fibroblastes sur le comportement des cellules endothéliales est évidente, cependant la réciproque l'est aussi. Les cellules endothéliales vont jouer un rôle sur le comportement des fibroblastes en sécrétant des facteurs chimiques qui vont se lier à la surface des fibroblastes. Les cellules endothéliales jouent un rôle fondamental dans la formation et la contraction du tissu matriciel notamment en sécrétant de l'endothéline-1 qui va permettre une augmentation de l'expression de l' α -SMA par les fibroblastes, et ainsi stimuler la contraction et la différenciation des fibroblastes sous forme de myofibroblastes¹¹⁸.

De plus, lorsque les CE et les fibroblastes sont en co-culture, les CE vont produire un facteur de croissance dérivé des plaquettes, le PDGF (*Platelet-Derived Growth Factor*). Cette glycoprotéine dimérique est composée soit de deux sous-unités A (PDGF-AA), soit de deux sous unités B (PDGF-BB) ou d'une de chaque (PDGF-AB). Le PDGF joue un rôle important dans la formation des vaisseaux sanguins, leur croissance mais aussi dans la mitogenèse donc la prolifération des cellules mésenchymateuses comme les fibroblastes et les cellules musculaires lisses vasculaires. Le PDGF agit aussi sur la chimiotaxie et la migration dirigée des cellules mésenchymateuses.

Enfin, comme nous l'avons évoqué précédemment, la présence de cellules endothéliales couplée à celle des fibroblastes est essentielle à la formation de vaisseaux sanguins mais n'est possible qu'en présence de matrice extracellulaire. Cette MEC agit comme un échafaudage pour la formation de ces vaisseaux sanguins et comme un piège qui va permettre de retenir et de concentrer les facteurs de croissance dans le micro-environnement des cellules¹¹⁹. De plus, des métalloprotéases matricielles (MMP) et des inhibiteurs tissulaires des métalloprotéases (TIMP) agissent directement sur la régulation de la dégradation de cette

MEC. Une fois le réseau vasculaire créé, les cellules endothéliales n'ont plus besoin de migrer et proliférer à travers la MEC, les fibroblastes vont alors sécréter des TIMP permettant d'inhiber la production de MMP et donc d'inhiber la dégradation de la MEC nouvelle reformer. En particulier, la sécrétion de TIMP-1 permet d'inhiber la production de la MMP-9 responsable de la dégradation de la membrane endothéliale¹²⁰.

Ces dernières années, des recherches ont montré que la thrombine joue également un rôle important dans le processus de réparation et de remodelage tissulaire en communiquant avec les cellules vasculaires, notamment les cellules endothéliales, les fibroblastes et les cellules musculaires lisses vasculaires^{121,122}. Les fibroblastes dermiques humains expriment à leur surface, les récepteurs PAR-1 et PAR-3, récepteurs de la thrombine. Ces récepteurs vont activer la libération d'IL-8 qui va ensuite permettre la sécrétion des MMP-2 et MMP-9¹²³.

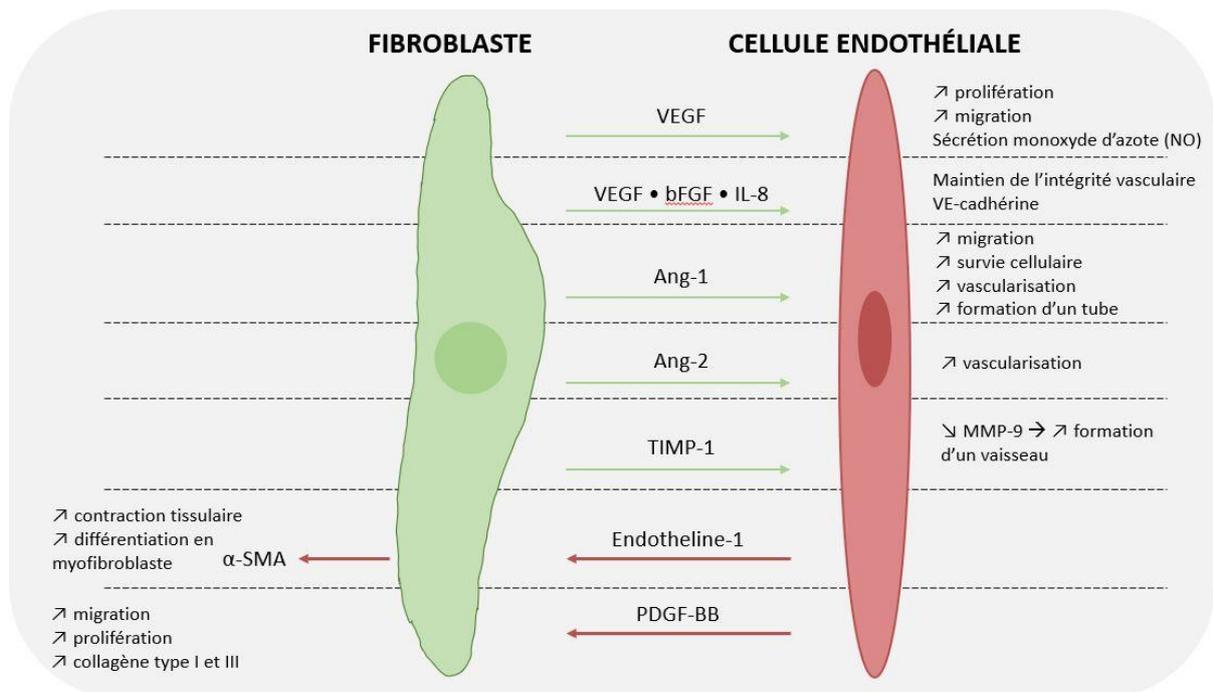


Figure 9 Représentation schématique des principales communications paracrine entre les fibroblastes et les cellules endothéliales pour le développement d'un tissu fonctionnel.

ii. Les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses vasculaires

La communication entre les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses vasculaires permet de réaliser deux fonctions totalement distinctes en fonction du besoin du vaisseau

sanguin : (i) les CE vont permettre aux CMLV de se contracter ou de se dilater en fonction de la pression sanguine traversant le vaisseau sanguin ou (ii) les CE vont attirer les CMLV pour qu'elles apportent un maintien lors de la formation d'un nouveau vaisseau sanguin et prennent ainsi le rôle d'une cellule stromale et plus particulièrement d'un péricyte (Figure 10).

Les cellules musculaires lisses de la couche media de la paroi vasculaire jouent un rôle essentiel dans le maintien de la structure et de la fonction des vaisseaux sanguins¹²⁴. Comme nous l'avons vu précédemment, les CMLV possèdent plusieurs phénotypes et un haut degré de plasticité¹²⁵. Dans les conditions physiologiques du vaisseau sanguin, les CMLV possèdent un phénotype contractile. Ce phénotype en particulier va permettre au vaisseau de se contracter ou se dilater sous l'effet du flux sanguin et donc en fonction de la pression artérielle. Les CMLV perdent ce phénotype et se différencient en phénotype synthétique lorsqu'elles sont soumises à un stress. Elles vont alors proliférer et migrer dans la paroi vasculaire. La paroi des vaisseaux sanguin subit des changements morphologiques sous l'influence d'un stress mécanique. Une augmentation de la pression artérielle est associée à une augmentation de la rigidité de la paroi et donc à une contraction de ce vaisseau. Lorsque la pression artérielle diminue, la rigidité de la paroi diminue aussi et une relaxation de la paroi artérielle est observée.

L'endothélium maintient l'homéostasie vasculaire grâce à la libération de vasodilatateurs actifs : le monoxyde d'azote (NO) et le facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium (EDHF), qui vont agir directement sur les cellules musculaires lisses vasculaires. Cette vasodilatation, ou hyperpolarisation dérivée de l'endothélium (EDH) s'effectue selon deux modes distincts : (i) *via* une diffusion de facteurs chimiques produits par la cellule endothéliale à travers la lame élastique interne (LEI) pour atteindre les CMLV et activer des canaux ioniques et (ii) *via* des jonctions myoendothéliales (MEGJ) qui permettent de relier directement entre elles les CE et les CMLV¹²⁶.

Le flux sanguin et donc la contrainte de cisaillement qu'il engendre sur la paroi vasculaire, va stimuler les CE qui vont produire du monoxyde d'azote (NO). Cette libération de NO va stimuler la guanylate cyclase (GC) à l'intérieur des CMLV qui va à son tour activer la production de guanosine monophosphate cyclique (cGMP). Cette production va alors activer des canaux K⁺ situés sur la membrane des CMLV. Ces canaux jouent un rôle essentiel dans le contrôle du potentiel membranaire et possèdent une activité déterminante envers un autre type de canal

présent sur la membrane des CMLV, les canaux Ca^{2+} voltage-dépendants (VDCC). Ce canal VDCC représente la passerelle principale pour l'entrée du Ca^{2+} dans la cellule musculaire lisse vasculaire. L'activation des canaux K^+ par la sécrétion de cGMP va alors induire une hyperpolarisation de la membrane des CMLV *via* le relargage de K^+ extracellulaire et ainsi induire la relaxation vasculaire. Cet effet est aussi induit *via* le facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium (EDHF) qui est défini comme un signal électrique généré et synthétisé par la cellule endothéliale et va affecter la CMLV directement *via* les jonctions myoendothéliales (MEGJ). Les CMLV vont ainsi subir une hyperpolarisation, provoquant le relâchement de la cellule¹²⁷.

A l'inverse, les cellules musculaires lisses vasculaires vont réaliser une contraction sous l'influence d'un stress électromécanique couplé à un signal chimio-mécanique. La CMLV possède des canaux K^+ qui vont jouer un rôle essentiel dans ces phénomènes et notamment dans le contrôle du potentiel membranaire. Les canaux K^+ possèdent une activité déterminante pour un autre type de canaux présents sur la membrane cellulaire des CMLV, les canaux Ca^{2+} voltage-dépendants (VDCC). Lors du phénomène de contraction, les canaux K^+ se ferment, entraînant une dépolarisation de la membrane des CMLV. Cette dépolarisation est associée à l'activation des canaux VDCC et donc à l'entrée du Ca^{2+} extracellulaire. Les mitochondries et le réticulum sarcoplasmique peuvent aussi libérer du Ca^{2+} à l'intérieur de la cellule. La concentration de Ca^{2+} intracellulaire augmente et entraîne par conséquent la contraction des CMLV¹²⁷.

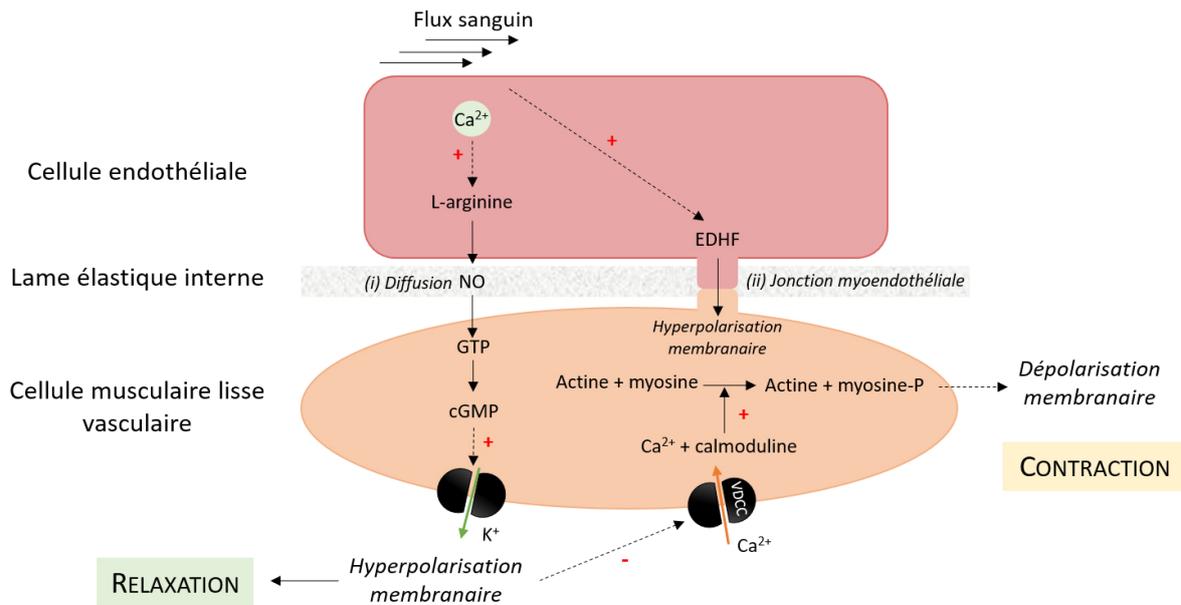


Figure 10 Représentation schématique des principales communications paracrines et juxtacrines entre la cellule endothéliale et la cellule musculaire lisse vasculaire lors du développement d'un tissu fonctionnel.

iii. Les cellules endothéliales et les péricytes

Comme nous l'avons vu précédemment, les péricytes sont impliqués dans plusieurs fonctions, notamment dans la formation de vaisseaux sanguins ainsi que dans leur stabilisation. Les vaisseaux sanguins se développent très tôt au cours de l'embryogénèse et, en association avec les cellules endothéliales, les péricytes vont jouer un rôle déterminant (Figure 11).

Au tout début, lors de la vasculogénèse dans l'embryon, les cellules endothéliales vont s'assembler pour former un premier réseau simple de capillaires. Une fois ce réseau formé, les capillaires vont s'agrandir et vont recruter des cellules péricytes/cellules musculaires lisses vasculaires pour stabiliser les structures formées par les cellules endothéliales. C'est l'étape d'angiogénèse. Cette étape inclut non seulement le recrutement des péricytes/CMLV, mais aussi la germination de nouveaux vaisseaux, l'invagination des cellules endothéliales ainsi que leurs pontages. C'est grâce à la communication complexe dans le tissu entre les cellules endothéliales et les péricytes que toutes ses étapes se produisent. Les interactions entre ces deux types cellulaires peuvent être de type paracrine ou juxtacrine, c'est-à-dire au moyen d'un contact physique entre les deux permettant ainsi d'affecter le taux mitotique de l'autre. Les péricytes, au contact de cellules endothéliales, vont induire leur différenciation et un arrêt de

leur croissance¹²⁸⁻¹³⁰. Toutes ces fonctions diverses sont médiées par la présence ou l'absence de facteurs de croissances angiogéniques *via* plusieurs voies de signalisation.

Le recrutement des péricytes

La migration des péricytes vers la cellule endothéliale est médiée par un complexe ligand-récepteur spécifique. Dans l'embryon, l'expression du facteur de croissance dérivé des plaquettes, PDGF-B, est restreinte aux cellules endothéliales et la concentration est très élevée dans les capillaires immatures en germination¹³¹. Dans un premier temps, les CE vont donc sécréter du PDGF-B qui va alors se fixer sur la membrane des péricytes *via* un récepteur PDGFR β . Cette sécrétion est hétérogène en fonction de la zone du vaisseau sanguin. Plus les CE se trouvent aux extrémités du vaisseau, c'est-à-dire à la pointe, plus elles vont sécréter du PDGF-B pour recruter des péricytes qui vont alors pouvoir migrer jusqu'aux cellules endothéliales. Il est important de noter que le développement des péricytes est toujours induit lorsque le complexe PDGF-B/PDGFR β est perturbé, cependant ils ne seront plus capables de migrer et de se propager le long des vaisseaux¹³².

La maturation des vaisseaux sanguins

Le complexe Ang-1/Tie-2 est aussi impliqué dans cette interaction. L'angiopoïétine-1 est exprimée par les péricytes alors que son récepteur Tie-2 est exprimé par les cellules endothéliales en développement^{133,134}. Une communication paracrine s'effectue alors entre les deux types cellulaires et permet de contrôler la maturation et la stabilité des cellules endothéliales. Ang-1 permet donc une stabilisation vasculaire mais aussi une réduction de la perméabilité vasculaire, une augmentation de l'organisation de la structure et de sa fonctionnalité¹³⁵. Lorsque l'antagoniste de Ang-1, Ang-2, est exprimé par les péricytes et vient se fixer au récepteur Tie-2, une perte de la stabilité du vaisseau due à l'absence de péricytes est observée. De plus, lorsque le VEGF est présent, Ang-2 va favoriser la germination des vaisseaux sanguins alors qu'au contraire, en absence de VEGF, Ang-2 va conduire à la mort des cellules endothéliales et à la régression des vaisseaux sanguins^{136,137}.

La sphingosine-1-phosphate (S1P) est elle aussi indispensable à la maturation vasculaire. Elle est exprimée par les cellules endothéliales mais aussi à un plus faible niveau par les péricytes. La S1P va ensuite se lier à un récepteur présent uniquement sur la cellule endothéliale, le S1P1. Cette liaison S1P/S1P1 est essentielle pour la molécule d'adhésion cellulaire N-cadhérine, liant la cellule endothéliale au péricyte¹³⁸ car elle permet de moduler la fonction

de barrière vasculaire et de réduire la perméabilité *via* le renforcement et la stabilisation de de cette jonction N-cadhérine.

La différenciation des péricytes

Le TGF β est aussi impliqué dans cette communication complexe. Il joue un rôle clé dans la formation, la différenciation et la prolifération des cellules murales, c'est-à-dire les cellules permettant un soutiens vasculaire tels que les fibroblastes, les cellules musculaires lisses et les péricytes. Il joue aussi un rôle dans la prolifération et la différenciation des cellules endothéliales¹³⁹. Les cellules murales et les cellules endothéliales expriment toutes les deux le TGF β ainsi que les récepteurs du TGF β : Alk-1 et Alk-5 (*activin receptor-like kinase*). Cependant, ils ne sont actifs que lorsqu'une communication entre les deux types cellulaires s'établit. Les récepteurs Alk-1 et Alk-5 du TGF β sont exprimés sur les deux types cellulaires mais jouent des rôles totalement différents. De son côté, l'activation de Alk-1 conduit à la phosphorylation de Smad1/5 et conduit à la prolifération et la migration cellulaire. D'un autre côté, l'activation de Alk-5 sur les cellules mésenchymateuses permet une phosphorylation de la quiescence mitotique et migratoire favorisant Smad2/3 et conduit à la différenciation des cellules mésenchymateuses en cellules stromales. Alk-1 est donc activé dans la phase précoce de développement du vaisseau sanguin alors que Alk-5 est activé plus tardivement¹⁴⁰.

Le VEGF, quant à lui, va stimuler les cellules endothéliales qui vont sécréter des protéases pour dégrader la membrane basale des vaisseaux. Elles vont passer d'un phénotype quiescent à un phénotype prolifératif. Cette action va permettre aux CE de se déplacer dans la MEC environnante en la dégradant, pour former une nouvelle colonne de cellules endothéliales proliférantes *via* le processus d'angiogenèse.

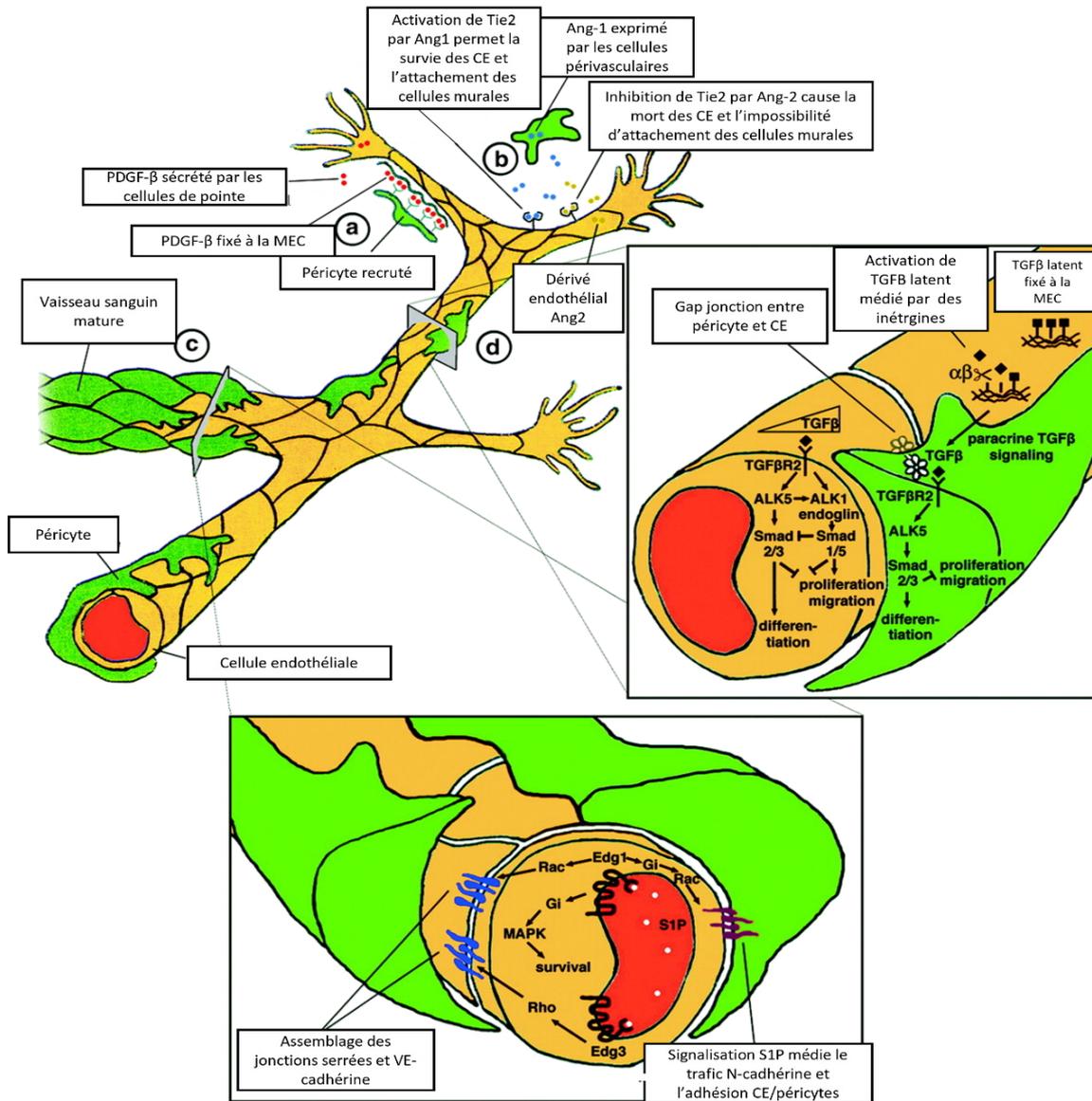


Figure 11 Représentation schématique de la communication paracrine entre la cellule endothéliale et le péricyte. Lors du développement d'un tissu vascularisé, plusieurs étapes se produisent : le recrutement des péricytes, la maturation puis la stabilisation du vaisseau sanguin et enfin la différenciation de la cellule endothéliale et du péricyte pour permettre de renouveler ce processus de formation d'un vaisseau sanguin. Traduit de ¹⁴¹

IV. Les biomatériaux, composant de la bioencres

Pour la création de structures vasculaires *via* la technologie de bioimpression 3D, un hydrogel composé d'un ou plusieurs biomatériaux est utilisé. Il compose alors une encres, qui va être mélangées aux cellules d'intérêt pour fabriquer une bioencres. Nous allons détailler

plusieurs des biomatériaux naturels, dont l'impact sur la conception d'une bioencore « idéale » se montre essentiel.

Les biomatériaux naturels utilisés en bioimpression 3D se doivent de posséder des caractéristiques biologiques, chimiques, mécaniques et d'imprimabilité appropriées¹⁴²⁻¹⁴⁴. Cette première étape, dite de formulation, est sans conteste la plus critique. Cette étape, et donc le choix méticuleux des biomatériaux, va permettre (i) une biocompatibilité parfaite reproduisant l'environnement naturel des cellules leur permettant d'adhérer, (ii) une imprimabilité de la bioencore lui permettant de former un objet en trois dimensions à l'échelle centimétrique et de fidélité élevée, (iii) une contrainte de cisaillement adaptée à la survie cellulaire lors de leur passage dans l'aiguille d'impression, (iv) une biodégradabilité de cette bioencore pour permettre aux cellules de proliférer et sécréter leur propre environnement matriciel et enfin (v) une production à grande échelle grâce à des variations minimales en fonction des lots des fournisseurs.

IV.1. L'alginate

IV.1.1. Description

L'alginate est un polysaccharide naturel anionique, obtenu à partir des algues brunes. Les algues sont récoltées, lavées, macérées puis subissent une étape d'extraction en utilisant du carbonate de sodium¹⁴⁵. Cette étape est suivie d'une filtration puis de précipitation grâce à l'ajout de chlorure de sodium ou de calcium. Cela permet d'obtenir un précipité fibreux d'alginate de sodium ou de calcium. Un traitement avec de l'acide chlorhydrique est effectué sur le précipité d'alginate afin de le transformer en acide alginique. Celui-ci est purifié puis séché et broyé pour obtenir de la poudre. Tout ce processus d'extraction permet alors d'aboutir à de l'alginate de sodium sec et en poudre.

Ce polysaccharide est constitué de deux unités acides uroniques : l'acide L-guluronique (G) et l'acide D-mannuronique (M), reliés ensemble par une liaison $\beta(1-4)$ et schématisé sur la Figure 12. La proportion et la distribution de ces deux monomères va définir les propriétés physico-chimiques de l'alginate et dépend de l'espèce ainsi que de la saison à laquelle il est extrait. Il existe trois types d'enchaînements des unités : (i) des blocs homopolymères d'unités d'acide mannuronique (-M-M-M-), (ii) des blocs homopolymères d'unité guluronique (-G-G-G-) ou (iii) des blocs copolymères d'unités d'acide mannuronique et guluronique (-M-G-M-)^{146,147}. La

masse moléculaire des alginates de sodium disponibles dans le commerce varie entre 32 000 et 400 000 g/mol. Plus cette masse moléculaire sera élevée plus la solution sera visqueuse et donc difficile à utiliser notamment pour la technologie de bioimpression 3D par extrusion¹⁴⁸. La viscosité de l'alginate dépend également du pH : cette viscosité augmente avec la baisse du pH pour atteindre un maximum de viscosité autour de pH 3-3,5¹⁴⁹. Dans le commerce, les alginates de plus hautes viscosité sont compris entre 1000 et 1500 mPa.s⁻¹ (pour comparaison la viscosité de l'eau est de 1 mPa.s⁻¹).

Les solutions d'alginate peuvent être réticulées sous l'action d'ions divalents comme le Ca²⁺, le Sr²⁺ ou le Ba²⁺ qui vont jouer le rôle d'agents de chelation^{146,150}. Les cations divalents se lieraient uniquement aux blocs d'unités acide L-guluronique (G) des chaînes d'alginate. Les blocs G d'une chaîne d'alginate vont alors former des jonctions avec les blocs G d'une autre chaîne, c'est ce qu'on appelle le modèle de la « boîte à œuf »¹⁵¹ où les œufs sont représentés par les ions divalents. Ces ions vont donc établir des ponts entre les fonctions carboxyliques portées par les chaînes adjacentes (Figure 12). Le chlorure de calcium (CaCl²⁺) est l'agent de réticulation le plus couramment utilisé. Cependant, le CaCl²⁺ conduit à une gélification rapide de l'alginate et donc très souvent incomplète. Cela peut être bénéfique pour des applications telles que la formation de microbilles d'alginate au cœur liquide et à la paroi rigide, mais peut aussi avoir des conséquences limitantes pour d'autres applications notamment lors de fabrications de structures 3D épaisses, se retrouvant alors avec un cœur d'alginate non chélaté et donc une dégradation prématurée de certaines zones de la structure. Pour permettre de ralentir ce phénomène et obtenir un hydrogel uniforme, plusieurs approches sont possibles¹⁴⁹ : (i) l'utilisation d'un tampon contenant du phosphate car les groupes phosphates vont entrer en compétition avec les groupes carboxylates de l'alginate en jeu lors de la réaction avec les ions calcium ; (ii) l'utilisation d'autres solutions de réticulation à base de calcium comme le sulfate de calcium (CaSO₄) ou le carbonate de calcium (CaCO₃), qui possèdent une solubilité plus faible que le CaCl²⁺ ; ou encore (iii) modifier la température de réticulation : à température plus basse, les agents de réticulation ionique ont une réactivité plus faible et la gélification se fait plus lentement¹⁵².

Le processus de gélification des solutions d'alginate est donc un facteur critique à étudier puisqu'il aura un impact direct sur la stabilité mécanique de l'objet 3D obtenu¹⁵³. La solution de réticulation ionique utilisée, l'environnement physiologique, ainsi que la composition de

l'alginate utilisé, sont des paramètres qui vont jouer directement sur le devenir du tissu désiré. Un alginate contenant une teneur élevée en résidus de blocs G aura une rigidité très élevée en comparaison avec un alginate qui aura une quantité plus faible de blocs G¹⁵⁴. Cela permet d'avoir un choix assez large en fonction du tissu que l'on veut recréer : il faudra moins de rigidité pour des tissus conjonctifs alors qu'une rigidité élevée sera demandée pour de l'os ou du cartilage.

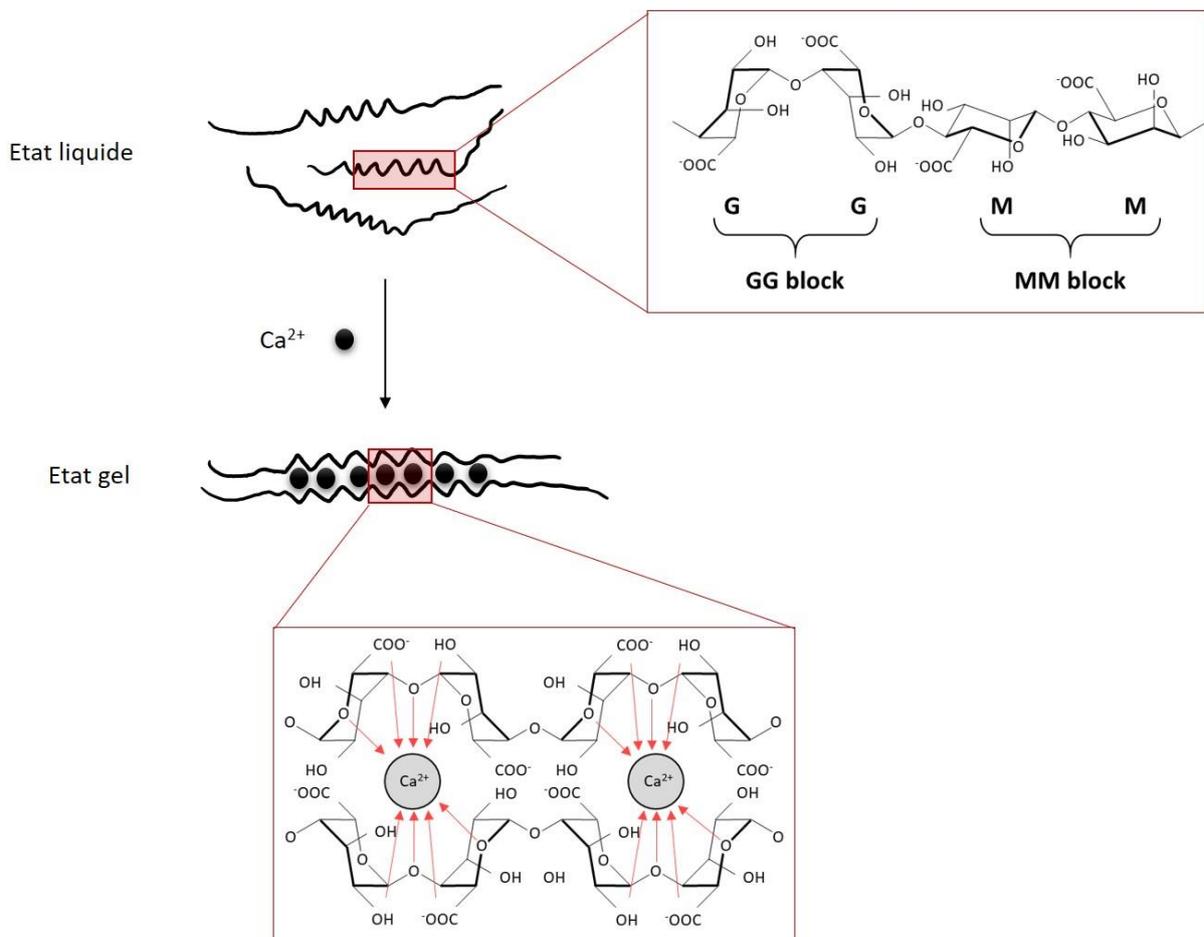


Figure 12 Processus d'assemblage des monomères d'alginate au cours de la chélation par le Ca^{2+} . L'alginate subit alors une transition d'un état liquide à un état gel.

IV.1.2. Utilisation en bioimpression 3D

L'alginate est largement utilisé en ingénierie tissulaire de par ses nombreux avantages : biocompatibilité, faible coût, facilité d'utilisation grâce à une solubilisation dans l'eau et propriétés de gélification contrôlables (chaleur, cations...) qui permettent des applications

notamment pour la cicatrisation, l'administration de médicaments, le relargage contrôlé de cellules spécifiques ou de facteurs de croissance¹⁵⁵.

Cependant, l'alginate de sodium ne possède pas de motifs d'adhésion cellulaire RGD (arginine-glycine-acide aspartique) et ne permet donc pas à des cellules d'adhérer à l'hydrogel et de proliférer jusqu'au développement d'un tissu. Pour contourner cet inconvénient, des alginates peuvent être modifiés chimiquement par l'ajout de peptides comprenant la séquence arginine-glycine-acide aspartique (RGD)¹⁵⁶⁻¹⁵⁸. Ces peptides sont alors couplés chimiquement au squelette d'alginate *via* la chimie des carbodiimides hydrosolubles¹⁵⁹. Ou alors, l'alginate peut être couplé à un autre polymère possédant déjà des propriétés d'adhésion cellulaire, comme la gélatine.

IV.2. La gélatine

IV.2.1. Description

La gélatine est un polypeptide biodégradable dérivé de l'hydrolyse partielle du collagène, qui est la principale protéine structurelle de la matrice extracellulaire (MEC) des cellules mammifères¹⁶⁰. Selon la source du collagène et les méthodes de traitements hydrolytiques, nous pouvons observer plusieurs types de gélatine.

Les gélatines porcines ou bovines, dérivées de mammifères, sont les plus utilisées en ingénierie tissulaire et notamment en bioimpression 3D^{161,162}. Elles ont des structures polypeptidiques similaires avec celles des êtres humains. D'autres gélatines issues de méduses, de plantes ou encore de poissons existent. Cependant, elles sont bien moins utilisées de par leur température de gélification plus basse, une stabilité thermique plus faible et une viscosité plus élevée¹⁶³.

Le passage du collagène de type I à la gélatine peut être décrit en trois étapes¹⁶⁴ : (i) le pré-traitement de la matière première, (ii) l'extraction de la gélatine et (iii) la purification et/ou le séchage du produit. C'est le processus de pré-traitement qui va définir le type de gélatine. L'hydrolyse acide du collagène de type I va aboutir à la gélatine de type A et l'hydrolyse basique du collagène de type I va aboutir à la gélatine de type B. La masse moléculaire de la gélatine est comprise généralement entre 15 000 et 400 000 g/mol.

La caractéristique principale de la gélatine est son comportement de gélification thermoréversible. En effet, elle peut se trouver à l'état de gel à des température comprises entre 20°C et 37°C et à l'état liquide à partir de 37°C (Figure 13).

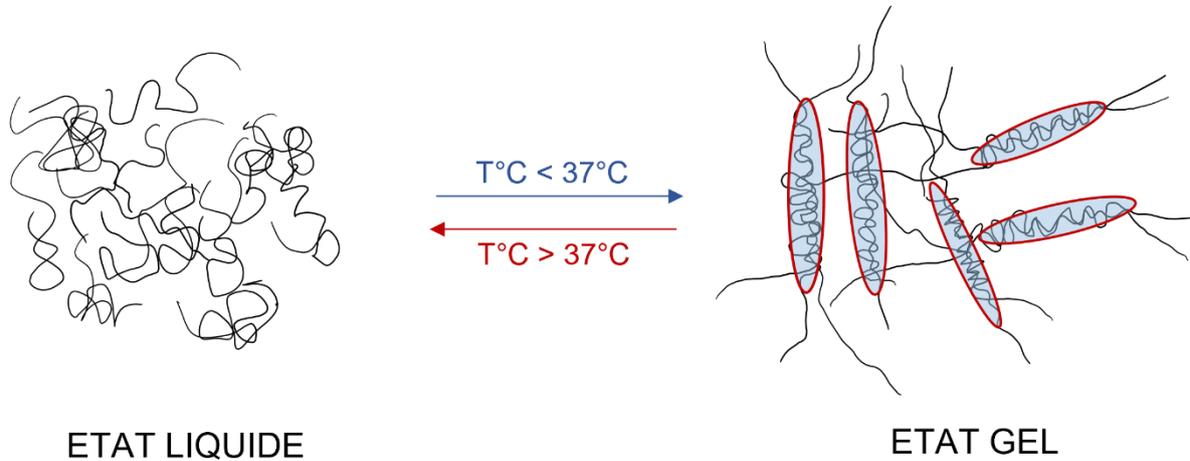


Figure 13 Représentation schématique du processus d'assemblage des chaînes de macromolécules de gélatine. La gélatine subit une transition d'un état liquide à un état gel lorsque la température est inférieure à 37°C.

IV.2.2. Utilisation en bioimpression 3D

La gélatine est plus utilisée par rapport au collagène de type I du fait de son faible coût, mais surtout du fait de la méthode de préparation du collagène qui nécessite une étape d'acidification pour sa solubilisation contrairement à la gélatine qui est un polymère soluble dans l'eau. L'utilisation de cellules directement dans le collagène de type I n'est donc pas possible.

La caractéristique principale de la gélatine, qui fait d'elle un hydrogel idéal pour la bioimpression 3D, est sa capacité de gélification réversible à de faibles température comprises entre 20°C et 37°C¹⁶⁵. Durant ce processus de gélification des liaisons non-spécifiques (hydrogènes, électrostatiques et hydrophobes) s'établissent permettant de reformer des structures de type triple-hélice (Figure 13). Ces liaisons non-spécifiques confèrent à l'hydrogel de gélatine un caractère thermoréversible unique car elles peuvent être facilement rompues lors d'une augmentation de température. Lorsque la gélatine est utilisée seule dans la formulation d'une bioencre, elle est utilisée pour sa propriété de support physique lors de la bioimpression. Cependant, pour une maturation cellulaire et la formation d'un tissu *in vitro* dans un incubateur à 37°C, 5% CO₂, son utilisation seule n'est pas possible. En effet,

l'ingénierie tissulaire nécessite une maturation cellulaire à 37°C. Or, à cette température la gélatine retrouve un état liquide ce qui a pour conséquence la dissolution de la structure 3D créée. Pour contourner cet obstacle, plusieurs solutions sont possibles : (i) l'ajout d'un autre polymère non thermosensible entre 20°C et 37°C¹⁶⁶, permettant un maintien de la fidélité du construit 3D lors de la maturation tissulaire à des températures physiologiques, (ii) l'ajout d'une étape de réticulation par exemple en présence de transglutaminase¹⁶⁷⁻¹⁷⁰, permettant la création d'un hydrogel de gélatine stable, ou (iii) une modification chimique de la gélatine, telle que la gélatine méthacrylate (GelMA) qui est une bioencres naturelle photoréticulable sous l'action d'une lumière ultra-violette^{161,171,172}.

IV.3. Le fibrinogène

IV.3.1. Description

Le fibrinogène est une glycoprotéine fibreuse et soluble de 340 kDa. C'est une protéine du plasma sanguin présente à des concentrations de 2 à 4 g/L. Elle va réagir à l'action de la thrombine. En effet, la thrombine est une protéase à serine qui va catalyser la transformation du fibrinogène en fibrine. En présence de thrombine mais aussi de Ca^{2+} , le fibrinogène est converti en un facteur insoluble : la fibrine. Cette conversion du fibrinogène en fibrine intervient pour assurer, avec les agrégats plaquettaires, l'hémostase au niveau d'une brèche vasculaire¹⁷³.

La molécule de fibrinogène est composée de trois paires de chaînes polypeptidiques $\text{A}\alpha$, $\text{B}\beta$, $\text{C}\gamma$, liées par des ponts disulfures. Elle est organisée sous forme d'un dimère symétrique possédant un domaine globulaire central E et deux domaines globulaires D aux extrémités. Ce domaine E regroupe les régions N-terminales des 6 chaînes et contient les fibrinopeptides A et fibrinopeptides B (respectivement, FPA et FPB). Les domaines D contiennent les régions C-terminales des chaînes $\text{B}\beta$, $\text{C}\gamma$ et une partie des chaînes $\text{A}\alpha$ ¹⁷⁴.

La thrombine (EC 3.4.21.5) quant à elle, est une protéase à sérine, c'est-à-dire une enzyme capable de couper les liaisons peptidiques d'une protéine, ici, le fibrinogène^{175,176}. Dans la cascade de coagulation, la prothrombine ou facteur II de coagulation, est clivée protéolytiquement par le facteur Xa, pour donner la thrombine active. Chez l'adulte humain, le taux sanguin normal d'activité de thrombine est de 1,1 unité/mL¹⁷⁷.

Lorsque ce taux atteint une certaine valeur, le fibrinogène va être converti en fibrine insoluble. Le mécanisme d'autoassemblage de la fibrine en fibrine insoluble se fait en plusieurs étapes successives, représentées sur la Figure 14¹⁷⁸ :

- i. La thrombine clive les extrémités N-terminales du domaine globulaire E et libère ainsi les fibrinopeptides A et B.
- ii. Des monomères de fibrines sont formés et s'apparient linéairement entre eux sous la forme de protofibrilles.
- iii. Les protofibrilles vont s'associer latéralement jusqu'à formation d'un réseau fibrillaire tridimensionnel.
- iv. Le polymère de fibrine ainsi formé est stabilisé sous l'action du facteur XIII, une transglutaminase. Celle-ci est activée en facteur XIIIa par la thrombine et en présence de Ca^{2+} . Ce facteur va créer des liaisons covalentes entre les résidus lysine et glutamine de deux monomères de fibrines adjacents.

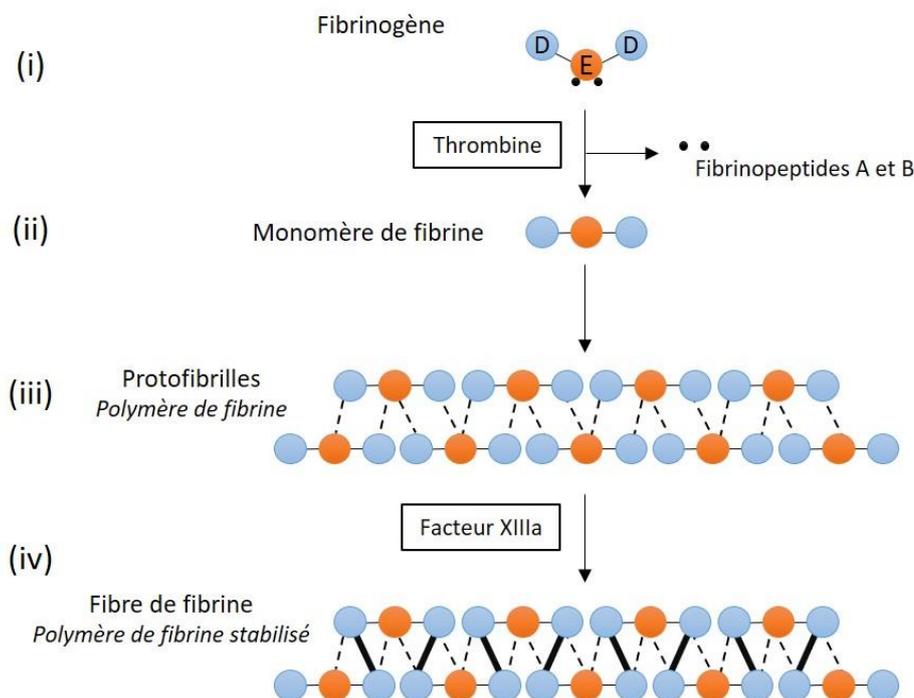


Figure 14 Représentation schématique du processus d'auto-assemblage du fibrinogène en fibrine insoluble. **(i)** Représentation de la molécule de fibrinogène. **(ii)** Représentation d'un monomère de fibrine après action de la thrombine clivant les fibrinopeptides présents sur la molécule de fibrinogène. **(iii)** Formation de protofibrilles, polymère de fibrine, par assemblage du motif de base de monomère de fibrine. **(iv)** Stabilisation du polymère de fibrine en une fibre de fibrine sous l'action du facteur XIIIa, une transglutaminase.

IV.3.2. Utilisation en bioimpression 3D

Le fibrinogène a longtemps été considéré comme un substrat inerte soumis à l'action de la thrombine. Or, ces dernières années, de nombreuses études se sont portées sur sa structure moléculaire et les nombreuses fonctions qui en résultent¹⁷⁹. En effet, c'est un système complexe permettant à la fois le remodelage tissulaire, la migration cellulaire mais pouvant aussi favoriser les phénomènes de thrombose. Une étude menée par Laurens et al.¹⁸⁰ a par exemple démontré que la cicatrisation tissulaire dépendait en grande partie de la structure du réseau de fibrine tel que l'épaisseur des fibres, le nombre de points de ramification, la porosité et la perméabilité. Des études ont aussi démontré la facilité des cellules endothéliales (CE), des fibroblastes et des cellules musculaires lisses à se fixer à ces réseaux de fibrine *via* les récepteurs intégrines mais aussi d'autres récepteurs tels que VE-cadhérine des cellules endothéliales¹⁸¹. Plus particulièrement les interactions entre la fibrine et les CE seraient impliquées dans la cicatrisation et l'angiogenèse. En effet, le chercheur Peter Carmeliet¹⁸² a démontré l'implication directe d'un hydrogel de fibrine implanté dans une souris sur le développement de microvascularisations en 4 jours. Enfin, Cox et al.¹⁸³ ont démontré le rôle d'un réseau de fibrine déposé dans une plaie tissulaire. La fibrine affecterait la prolifération et la migration des fibroblastes, permettant ainsi d'améliorer la cicatrisation chez les patients diabétiques par exemple.

Enfin, sur la Figure 15, nous pouvons identifier la différence de comportement de l'alginate, du fibrinogène et de la gélatine lorsqu'ils sont utilisés seuls en bioimpression par rapport à leur utilisation lorsqu'ils sont mélangés pour former une seule bioencres. En effet, lorsque les trois biomatériaux sont mélangés, leurs propriétés respectives permettent d'obtenir une bioencres imprimable, idéale pour l'ensemencement cellulaire ainsi que pour le développement de structure en trois dimensions à une température ambiante (21°C).

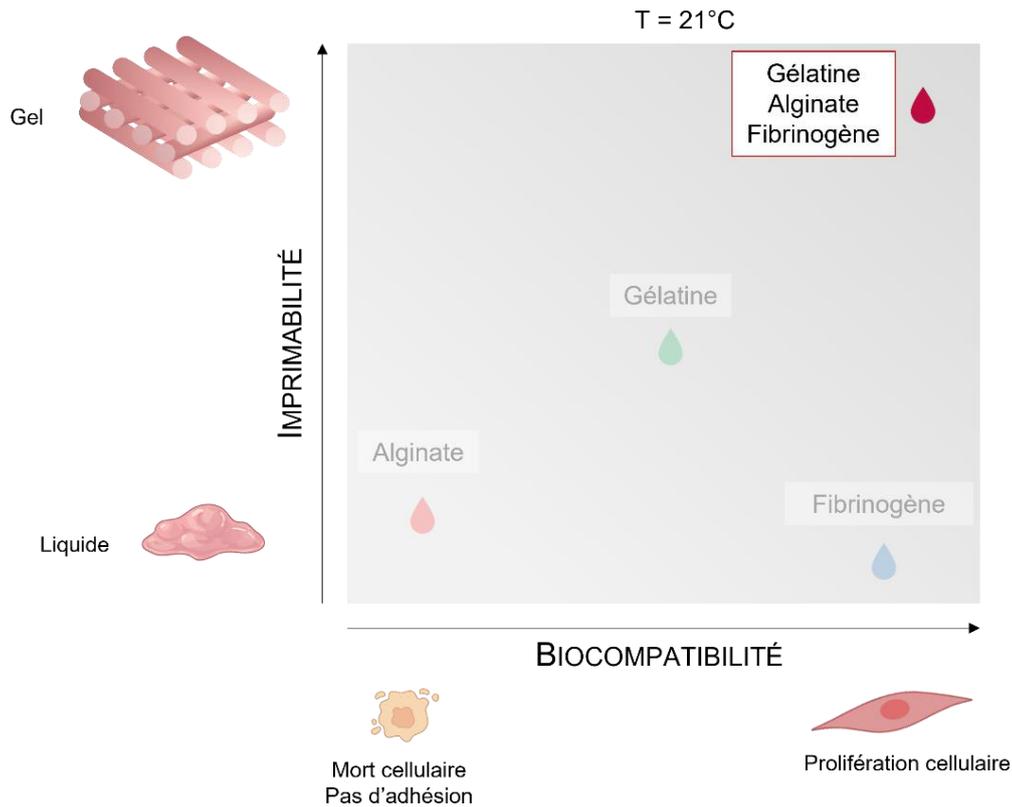


Figure 15 Représentation schématique du comportement des trois biomatériaux composant de la bioencres, l'alginate, la gélatine et le fibrinogène, lorsqu'ils sont utilisés seuls en bioimpression 3D ou lorsqu'ils sont utilisés ensemble pour former une unique bioencres aux propriétés d'imprimabilité optimales.

V. La biofabrication de tissus vasculaires

Comme nous l'avons détaillé précédemment, le réseau vasculaire est composé de plusieurs tailles de vaisseaux sanguins. La macrovascularisation, correspondant aux gros vaisseaux (diamètre > 6 mm), permet le transport efficace du sang vers les sites éloignés alors que la microvascularisation correspondant aux plus petits vaisseaux (diamètre < 6 mm), permet un apport efficace de nutriments et d'oxygène aux tissus environnants ainsi que l'élimination des déchets. Nous allons ainsi voir que ces deux grandes catégories de vaisseaux, dont les fonctions diffèrent, vont naturellement avoir leurs propres exigences de biofabrication.

V.1. Ingénierie tissulaire macrovasculaire

La macrovascularisation correspond aux vaisseaux sanguins de diamètres supérieurs à 6 mm, c'est-à-dire aux artères et aux veines. Leur rôle est d'assurer un transport sanguin vers des zones tissulaires éloignées. L'ingénierie tissulaire pour la macrovascularisation s'intéresse particulièrement dans la reconstruction des gros vaisseaux de type artère étant donné que la majorité des occlusions rencontrées chez les patients se situent dans ces zones du réseau vasculaire.

V.1.1. Les premiers travaux effectués

Cela fait plus d'un demi-siècle que les greffes vasculaires à partir de matériaux totalement synthétiques ont été créées et sont couramment utilisées en clinique pour remplacer les vaisseaux sanguins de plus gros diamètre uniquement, c'est-à-dire les vaisseaux sanguins possédant des diamètres supérieurs à 6 mm. Dans ces années 1950, la création et l'utilisation en clinique de vaisseaux sanguins de diamètres plus faibles, inférieurs à 6 mm, entraînaient de nombreuses complications et étaient donc peu utilisés^{184,185}.

En 1979, les chercheurs Herring et al. créèrent le tout premier greffon synthétique doté d'une couche de cellules endothéliales¹⁸⁶. Pour cela ils ontensemencé des cellules endothéliales directement sur un matériau synthétique, le Dacron®. Cependant, l'utilisation de matière synthétique reste toujours problématique en raison de la non résorbabilité du greffon vasculaire dans le temps. La recherche scientifique s'est donc poursuivie avec comme objectif de créer des VSIT composés de polymères biodégradables.

Les vaisseaux sanguins d'ingénierie tissulaire (VSIT) sont alors apparus. Ces nouveaux vaisseaux sanguins sont développés à partir d'un échafaudage de polymères biodégradables puis sontensemencés par des cellules vasculaires pour reproduire enfin, un vaisseau sanguin avec une paroi formée de trois couches vasculaires. Cette émergence de VSIT était le projet de Weinberg et Bell⁶. Lors de leurs travaux en 1986, les deux chercheurs ont réalisé le tout premier VSIT composé de collagène, sur lequel ils ontensemencé des cellules endothéliales pour former la couche la plus interne, des cellules musculaires lisses vasculaires pour former la couche intermédiaire, et enfin des fibroblastes pour former la couche externe de la paroi vasculaire, l'adventice. La faiblesse de ce modèle fut sa faible résistance mécanique. En effet, des résistances entre 120 et 180 mmHg ont été obtenues, contre des résistances allant de

2000 mmHg pour la veine saphène et jusqu'à 3000 mmHg pour l'artère mammaire chez l'Homme¹⁸⁷. Toutefois, cette recherche a démontré la faisabilité de réaliser une greffe de vaisseaux sanguins développés par génie tissulaire et formés à partir de cellules humaines.

La capacité des greffons vasculaires à résister à de fortes pressions physiologiques sans utiliser de polymères synthétiques est cependant restée un mystère jusqu'en 1998 où l'Heureux et al. développèrent le tout premier vaisseau sanguin d'ingénierie tissulaire entièrement biodégradable¹⁸⁸. En effet, les chercheurs créèrent le premier VSIT basé exclusivement sur l'utilisation de cellules humaines cultivées *in vitro* et sans utilisation de matériel synthétique ou exogène. L'Heureux et al. ont réussi à fabriquer les trois couches de la paroi vasculaire grâce à l'utilisation de fibroblastes qui ont pu sécréter leur propre matrice extracellulaire (MEC) et donc former la couche externe du vaisseau, l'adventice. Ils ont ensuite ensemencé les cellules musculaires lisses vasculaires à l'intérieur de la couche de MEC pour former la media et enfin ils ont ensemencé les cellules endothéliales pour former l'intima. Les tests mécaniques ont révélé une résistance mécanique de 2600 mmHg, ce qui était très encourageant pour une VSIT entièrement en matière biologique. Malheureusement ce VSIT a démontré une durée de vie relativement courte de 6 jours, qui est donc incompatible avec l'implantation.

Aujourd'hui plusieurs méthodes d'ingénierie tissulaire ont ainsi émergé pour faire face à ces problématiques concernant : la durée de vie du greffon, sa biodégradabilité et sa résistance mécanique à des pressions physiologiques.

V.1.2. Les biomatériaux

Des polymères synthétiques non dégradables ont été largement utilisés dans un premier temps en ingénierie de greffons vasculaires pour diverses raisons, notamment au niveau de la facilité et la flexibilité d'adapter les propriétés mécaniques en fonction du vaisseau sanguin à reproduire. C'est l'ePTFE qui a été principalement utilisé pour les greffes vasculaires. Cependant ce polymère ne démontrait ni une perméabilité suffisante ni de capacité d'endothélialisation par le système hôte^{189,190}. Un autre polymère synthétique non dégradable largement utilisé est le Dacron®, notamment pour les remplacements aortiques^{191,192}. Ces greffons possèdent généralement une finition en velours interne, externe ou les deux,

permettant d'améliorer l'ancrage cellulaire et donc l'intégration du greffon. Cependant le Dacron a démontré une perméabilité aussi faible que pour les greffons en ePTFE¹⁹³.

Les faibles taux de perméabilité de ces polymères synthétiques ont alors fait évoluer les stratégies vers une amélioration de la structure interne des greffons et permettre ainsi une meilleure régénération tissulaire. Pour cela, des modifications sont apportées à ces polymères. Par exemple, les travaux de Nishibe et al ont démontré que l'ajout de fibronectine aux greffes d'ePTFE permettait d'améliorer grandement la cicatrisation¹⁹⁴. D'autres études ont démontré que le couplage de motifs d'adhésion cellulaire RGD améliorait considérablement d'attachement des cellules endothéliales, de manière supérieure à celle créée grâce à la fibronectine^{195,196}. Des greffons d'ePTFE imprégnés de fibrine contenant le facteur de croissance FGF-1 ont permis de favoriser l'endothélialisation¹⁹⁷. Cependant, malgré une amélioration au niveau de l'endothélialisation, la présence toujours persistante de polymères synthétiques dans ces greffons induit des réponses inflammatoire et thrombotiques¹⁹⁸.

De nos jours, des polymères synthétiques biodégradables ainsi que des polymères naturels sont généralement utilisés. Un des enjeux pour le choix du ou des biomatériaux à utiliser est leur capacité à mimer la matrice extracellulaire du vaisseau sanguin.

L'utilisation de polymères synthétiques biodégradables ensemencés de cellules permet au greffon de se dégrader progressivement et une nouvelle matrice est générée. Les polymères généralement utilisés sont l'acide polyglycolique (PGA), le polycaprolactone (PCL), l'acide polylactique glycolique (PLGA)¹⁹⁹⁻²⁰². Durant leur travaux, Niklason et al ont développé un greffon en PGA ensemencé de cellules musculaires lisses bovines et de cellules endothéliales bovines, qui ont proliférées et maturées à l'intérieur d'un bioréacteur, permettant ainsi de résister à une pression de 2300 Hz²⁰³. Ils ont relié cette stabilité mécanique à la présence de CMLV. Cependant, la fabrication de ce même greffon mais avec des cellules humaines a démontré une résistance mécanique médiocre en raison de la capacité très limitée des CMLV humaines à proliférer. L'utilisation de ces greffes vasculaires à base de polymères biodégradables a montré de réels avantages par rapports aux polymères non dégradables, cependant des limitations au niveau de la culture cellulaire ont été soulevées. Effectivement l'approvisionnement des cellules pour ensemencer et fabriquer ces greffons suscitent de longues périodes de cultures qui varient entre 2 et 6 mois²⁰².

Une stratégie alternative à l'utilisation de polymères synthétiques dégradables est le développement de greffons à base de polymères naturels, imitant ainsi la matrice extracellulaire native des vaisseaux sanguins. Cette stratégie repose sur l'adhésion, la migration, la prolifération cellulaire et la synthèse de MEC à partir de ces échafaudages naturels. Le collagène est particulièrement utilisé dans la fabrication de greffons vasculaire car faisant parti des principaux composants de la paroi vasculaire²⁰⁴. En effet, le collagène a l'avantage de permettre l'adhésion cellulaire et aussi grâce à l'orientation de ses fibres, de permettre une résistance élevée de la paroi vasculaire^{205,206}. La fibrine est aussi largement utilisée comme polymère naturel²⁰⁷. Une étude a démontré que les CMLV lorsqu'elles sontensemencées dans un gel de fibrine, produisent plus de matrice extracellulaire que lorsqu'elles sont dans un gel de collagène²⁰⁸. L'élastine est aussi beaucoup utilisée notamment pour ses capacité élastiques, un paramètre clé dans la conception d'un greffon vasculaire²⁰⁹.

D'autres méthodes pour utiliser une source de biomatériaux naturels mimant la matrice est l'utilisation de sources tissulaires alternatives. Pour cela, la décellularisation de matrice extracellulaire allogénique ou xénogénique provenant principalement de la veine ombilicale, peuvent être utilisée²¹⁰. L'inconvénient de cette méthode est l'incapacité d'adapter l'architecture du vaisseau sanguin ainsi obtenu.

La MEC peut également être produite directement par les cellules cultivées *in vitro*. En effet, les fibroblastes sont capables de sécréter de grandes quantités de matrice extracellulaire composée de collagène, d'élastine et de fibronectine²¹¹. Cette dernière méthode est particulièrement intéressante étant donné que la composition et l'organisation de la matrice extracellulaire synthétisées par les cellules est directement reliée à la MEC physiologique²¹².

V.1.3. Les techniques de biofabrication

Un des principaux critères de réussite d'un gros vaisseau sanguin est sa durée de vie après son implantation. Il devra de plus posséder des propriétés mécaniques suffisantes pour résister au flux sanguin, être non thrombogénique et posséder des capacités de remodelage pour pouvoir s'intégrer correctement au système hôte²¹³. Le remodelage tissulaire du greffon comprend la migration des cellules endothéliales avec un contact entre celles du greffon et celles du patient, la migration des cellules musculaires lisses, et une néosynthèse de matrice autour du greffon pour établir une homéostasie mécanique parfaite^{214,215}. Pour reconstruire

ce type de vaisseaux sanguins, des méthodes d'ingénierie classiques et des méthodes d'ingénierie avancées sont utilisées.

i. Ingénierie macrovasculaire classique

Les méthodes classiques d'ingénierie tissulaire les plus couramment utilisées pour concevoir des larges vaisseaux sanguins sont : les feuillets cellulaires, le moulage d'une structure tubulaire et l'utilisation d'échafaudage qui serontensemencés par la suite.

Les feuillets cellulaires

La technique d'ingénierie vasculaire utilisant des feuillets cellulaires est basée sur le développement de couches de cellules cultivées *in vitro* en 2D jusqu'à leur confluence^{216,217}. Les cellules d'intérêt sont donc cultivées dans une boîte au fond traité, puis une fois que les cellules sont arrivées à confluence, le feuillet cellulaire ainsi formé est enroulé autour d'un mandrin pour aboutir à la formation d'une première couche tubulaire cellularisée. Le principe est reproduit de la même manière en fonction du nombre de couche souhaitée et des différents types cellulaires utilisés (Figure 16A). Grâce à la présence de cellules, les différents feuillets à l'intérieur du greffon sont progressivement remodelés. D'autres adaptations de cette première méthode ont été réalisées : les feuillets peuvent être formés directement de deux types cellulaires dans la même boîte de culture (Figure 16B) ou les cellules peuvent êtreensemencées sur une couche de biomatériaux permettant d'améliorer la tenue mécanique finale du feuillet (Figure 16C) et enfin, les feuillets peuvent être simplement assemblés les uns sur les autres permettant de mimer essentiellement la composition de la paroi vasculaire, sans la contrainte de l'architecture tubulaire^{37,188,218–223} (Figure 16D). L'épaisseur de chaque couche peut être modulée en assemblant plus ou moins de feuillets cellulaires²²⁴.

Généralement, les feuillets cellulaires développés peuvent être attachés et détachés d'une boîte de culture possédant un revêtement sensible à la température. En effet, le revêtement utilisé, du poly-N-isopropylacrylamide à l'échelle nanométrique, permet le détachement des cellules grâce à son changement de comportement hydrophobe à hydrophile lorsqu'il est placé à des températures inférieures à 25°C^{225,226}.

Cette approche de feuillet cellulaire est souvent utilisée car facilement réalisable seulement la résistance mécanique et l'intégrité des feuillets cellulaires développés doivent être améliorées.

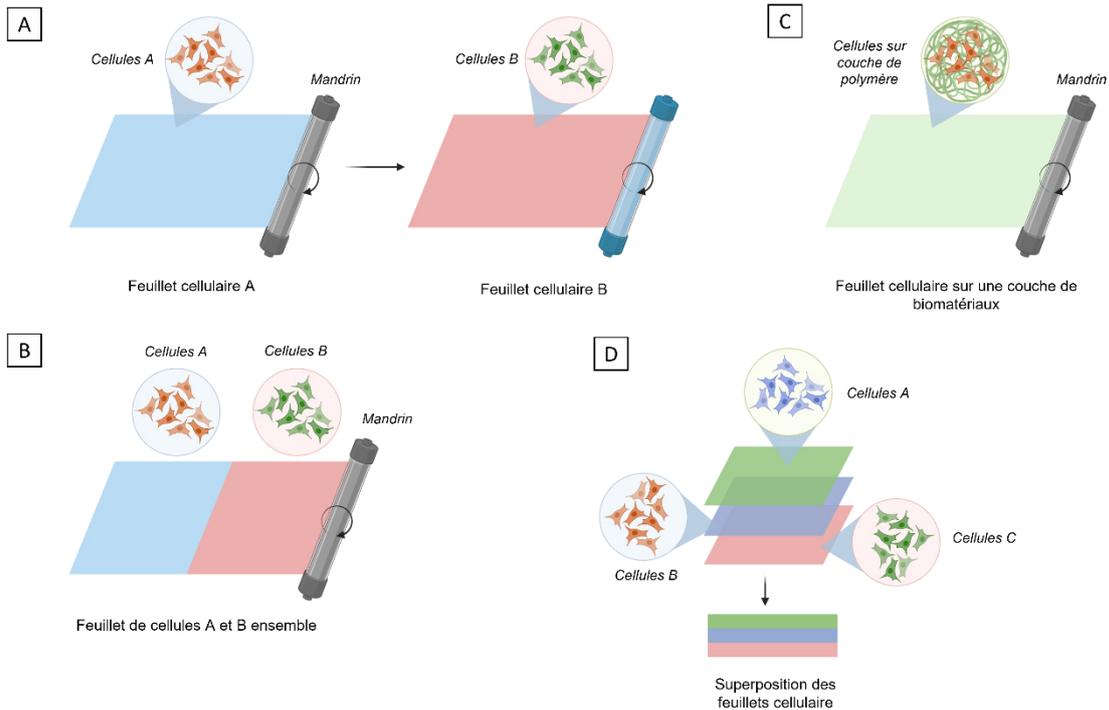


Figure 16 Représentation schématique de la biofabrication d'un tissu vasculaire par l'approche de feuillets cellulaire. **(A)** Une structure tubulaire est formée grâce à l'enroulage d'une feuille de cellules obtenue par culture 2D, autour d'un mandrin. Formation d'une seconde couche par enroulage d'une autre feuille cellulaire autour de la première feuille cellulaire. **(B)** Culture 2D de cellules sur une feuille de biopolymère pour permettre améliorée la tenue mécanique, puis enroulage de cette feuille autour d'un mandrin. **(C)** Culture 2D dans la même flasque, de deux types cellulaires différents puis enroulage de cette feuille bicellulaire autour d'un mandrin. **(D)** Fabrication d'une structure multicouche par empilements de différentes feuillets cellulaires les unes sur les autres. Cette dernière permet l'étude approfondie de la communication cellulaire entre les différentes couches de la paroi, en s'affranchissant de la difficulté d'obtenir une structure tubulaire.

Le moulage

La technique de moulage de biomatériaux a pour principal avantage de pouvoir créer des structures tridimensionnelles d'architecture personnalisée²²⁷⁻²³⁰. Cette méthode est basée sur un procédé simple : une solution de biomatériaux mélangée avec des cellules d'intérêt est déposée dans un moule correspondant à la forme externe de la structure désirée. Une fois que la solution de biomatériaux s'est solidifiée grâce à des réticulations ioniques, enzymatiques ou environnementales, le moule peut alors être retiré délicatement et la structure formée est libérée (Figure 17). Le principale avantage de cette technique est qu'une large gamme de formes est possible à réaliser en modifiant simplement l'architecture du moule.

C'est cette approche de biofabrication que les auteurs Weinberg et al²³¹ ont utilisé en 1986 pour le développement du premier tissu vasculaire par ingénierie tissulaire en déposant une

solution de collagène mélangé de cellules musculaires lisses vasculaires dans un moule cylindrique. Après quelques minutes à 37°C le mélange peut gélifier. Après 1 semaine de maturation, un treillis de Dacron a été glissé autour de la structure de collagène pour renforcer sa tenue. Les fibroblastes ont été déposés dans le moule à l'extérieur de la couche de CMLV. Après 2 semaines de maturation, le moule fut retiré pour laisser uniquement la structure tubulaire formée d'une couche de CMLV et d'une couche de fibroblastes. Enfin les cellules endothéliales ont été ensemencées à l'intérieur de la structure.

Dans leur travaux, Helms et al. ont réalisé un vaisseau sanguin bioartificiel composé de trois couches distinctes grâce à la technique de moulage étape par étape²³². Dans un premier temps ils ont différencié des cellules stromales adipeuses en cellules musculaires lisses vasculaires qu'ils ont intégré dans une matrice tubulaire de fibrine coulée dans un moule pour créer la couche centrale, la media. Dans une seconde étape, une matrice de fibrine acellulaire, imitant la couche externe adventice, a été moulée autour de la couche de CMLV. Enfin, pour reproduire l'intima, la couche interne de la paroi vasculaire, des cellules endothéliales ont été ensemencées à l'intérieur de la structure moulée grâce au passage d'un flux.

Etape 1 : ensemencement + maturation cellulaire

Etape 2 : retrait du moule

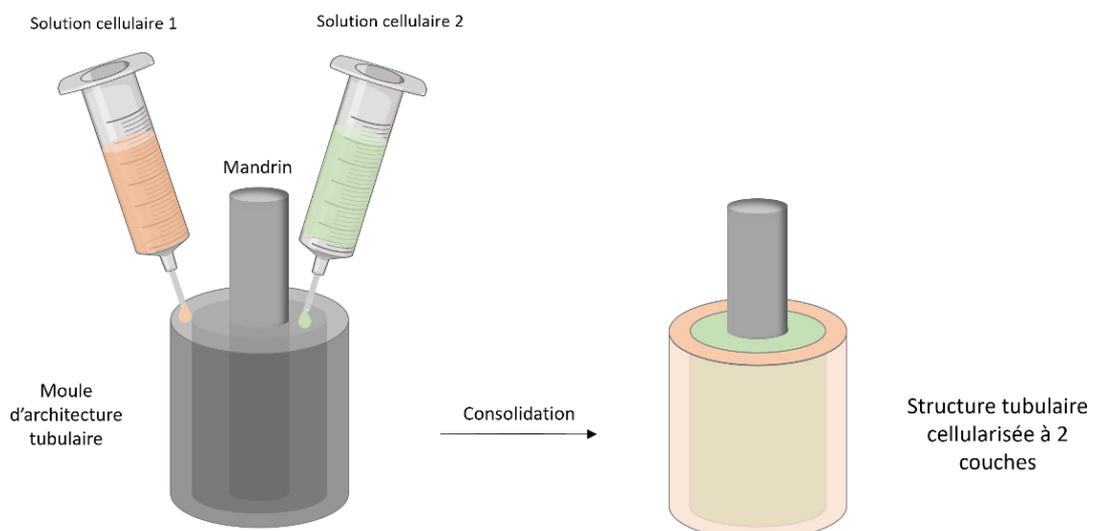


Figure 17 Fabrication d'un échafaudage cellularisé à l'aide de la technique de moulage. Des solutions de biomatériaux mélangées à des cellules sont versées à l'intérieur d'un moule de forme prédéfini. Une étape de consolidation permet de stabiliser la structure tubulaire pour qu'elle soit retirée du moule.

L'échafaudage

Les stratégies de biofabrication d'un échafaudage sont très prometteuses pour l'ingénierie tissulaire vasculaire et la médecine régénérative. En effet, contrairement aux méthodes précédentes de moulage et de feuillets, cette approche donne la possibilité de créer des architectures en trois dimensions avec un contrôle de la porosité, paramètre clé pour l'intégration d'un greffon vasculaire, principalement pour l'adhésion cellulaire et la régénération cellulaire²³³. En effet, cette architecture permet une amélioration de la croissance cellulaire grâce à la diffusion augmentée de nutriments à travers les porosités de cette structure, facilitant ainsi la néoformation du tissu en parallèle à la biodégradation des matériaux²³⁴⁻²⁴¹.

Cette méthode est ainsi réalisée en deux étapes distinctes : la conception de l'échafaudage poreux puis l'ensemencement des cellules cultivées en 2D *in vitro*. La structure biocompatible et poreuse de l'échafaudage permettra aux cellules d'adhérer à ce support, de migrer, de proliférer et enfin de remodeler le tissu vasculaire.

Fabrication de l'échafaudage

La première étape est de développer un échafaudage qui servira par la suite de support pour les cellules vasculaires. Au niveau des approches d'ingénierie vasculaire classiques, l'utilisation d'un tissu xénogénique est une des méthodes particulièrement utilisée. Le tissu provenant généralement de porcs, est par la suite décellularisé c'est-à-dire que les cellules du tissu sont retirées. Cette décellularisation peut être effectuée par des méthodes physiques, chimiques et enzymatiques^{242,243}. Le détergent le plus connu et généralement utilisé est la trypsine²⁴⁴. Cependant la trypsine peut perturber l'intégrité de la matrice et doit être utilisée de manière bien équilibrée. Pour remédier à son utilisation, d'autres protocoles utilisent maintenant le TRITON-X, un détergent non ionique²⁴⁵⁻²⁴⁷. Enfin, le dodécyl sulfate de sodium (SDS) peut aussi être utilisé comme détergent ionique dans la décellularisation et a été utilisé principalement pour la décellularisation de tissus conjonctifs²⁴⁵.

Un des avantages de l'utilisation de tissus xénogéniques, par rapport à la création *de novo* d'un échafaudage biocompatible dans son ensemble, est la préservation presque complète de l'architecture de la paroi vasculaire et régit la résistance mécanique du tissu. L'idée d'utiliser des tissus provenant d'une autre espèce a été particulièrement appréciée dans les débuts d'ingénierie tissulaire du fait de leur large disponibilité par rapport aux tissus humains.

Néanmoins, malgré cette forte disponibilité, la problématique réside principalement dans leur utilisation qui pourrait être entravée par d'éventuelles réponses immunitaires sévères de l'hôte lors de leur implantation^{248,249}. Des méthodes améliorées de décellularisation ont tout de même permis de réduire ce risque mais l'élimination totale de biomolécules étrangères impliquant une réponse immunogène reste tout de même un défi²⁵⁰.

Une autre technique classique permettant de fabriquer un échafaudage poreux pour reproduire un tissu vasculaire est l'électrofilage²⁵¹. Cette méthode permet d'obtenir des fibres caractérisées par un diamètre différent en fonction de ce que l'on souhaite, allant du nano au micromètre. Ses fibres sont de composition en polymères synthétiques²⁵². Les polymères naturels comme le collagène, la gélatine ou encore la fibrine sont ajoutés ultérieurement après la formation de l'échafaudage, permettant ainsi d'améliorer l'attachement et le développement cellulaire.

Comme schématisé sur la Figure 18, le procédé d'électrofilage repose sur l'utilisation d'une seringue contenant le polymère d'intérêt et connectée à une pompe qui va fournir un débit d'alimentation constant et contrôlable. Une force électrostatique est ensuite appliquée à la sortie de la seringue pour étirer la solution éjectée de manière filière. Lorsqu'une haute tension est appliquée sur l'aiguille métallique, une force de répulsion se forme, car les charges induites sont uniformément réparties sur la surface de la goutte de polymère qui sort de l'aiguille métallique. Lorsque les forces électrostatiques dépassent la tension superficielle de la solution viscoélastique, le jet jaillit de la filière. Au fur et à mesure que la phase d'allongement se poursuit, l'emplacement de la charge dans le jet formé commence à changer. Ce processus de flexion continue rend le jet instable, ce qui entraîne un certain nombre d'instabilités de flexion, qui jouent un rôle crucial dans la réduction du diamètre du jet. Dans un champ électrique, le solvant s'évapore pendant le processus d'étirement du jet et finalement, les solutés se solidifient sur le collecteur²⁵³⁻²⁵⁶.

Les fibres de polymères ainsi déposées sont capables de former un maillage extrêmement poreux. Cette technique d'électrofilage permet aussi de produire en simultané des fibres de plusieurs polymères différents ou encore l'électrofilage coaxial permet de créer des fibres composées d'un cœur et d'une coque en polymères distincts. L'électrofilage des deux polymères est alors contrôlée indépendamment l'une de l'autre. Pour des applications en

ingénierie vasculaire, les fibres de polymères sont déposées sur un collecteur rotatif, permettant ainsi de former une structure tubulaire avec des fibres orientées²⁵⁷. L'inconvénient de l'électrofilage est que cette approche utilise des forces électriques élevées et ainsi que des solvants organiques pour dissoudre les polymères, rendant alors impossible le dépôt de cellules directement. Une étape supplémentaire intégrant l'ajout de polymères naturels est alors obligatoire.

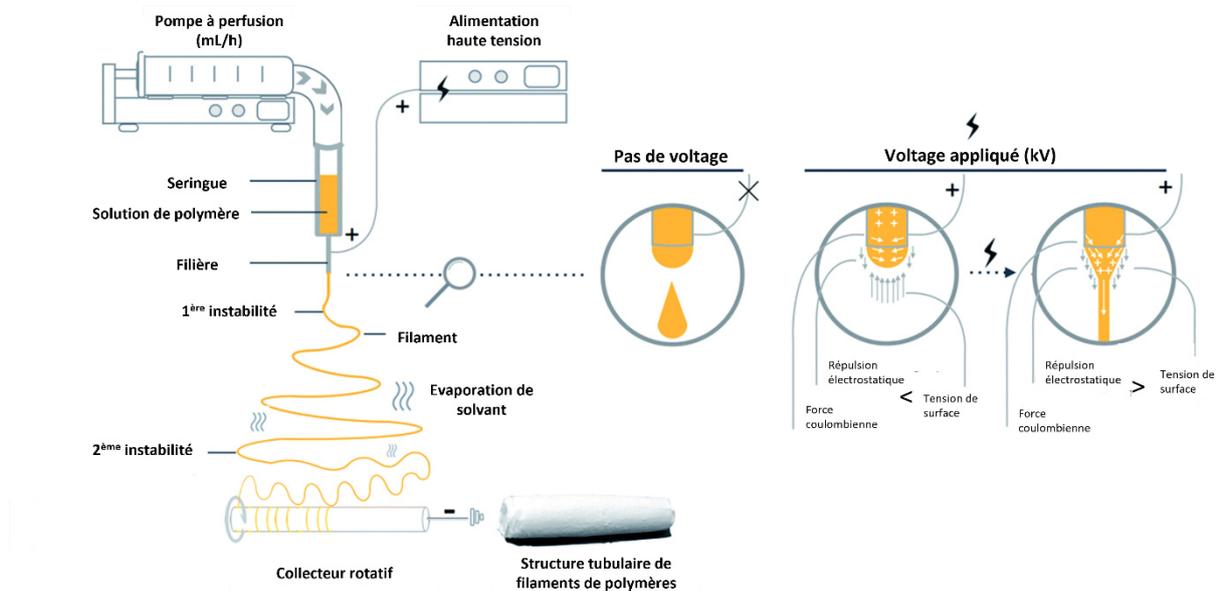


Figure 18 Représentation schématique du procédé d'électrofilage pour l'ensemencement de cellules. La technique d'électrofilage permet de produire une structure filaire de l'ordre du nanomètre, sur un collecteur rotatif pour obtenir un greffon synthétique. La structure poreuse permet une adhésion ensuite des cellules *via* un ensemencement.

Ensemencement de l'échafaudage :

Une fois que l'échafaudage est fabriqué, l'ensemencement cellulaire devient l'étape la plus critique dans la réalisation du système vasculaire fonctionnel récapitulé. Plusieurs critères doivent être respectés : la densité, l'homogénéité et l'intégrité des cellules²⁵⁸. En effet, les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses et les fibroblastes sont chacune présentes dans différentes couches et doivent donc se localiser respectivement à la surface du tube, à l'intérieur et à l'extérieur.

Généralement l'échafaudage créé est immergé dans la solution cellulaire d'intérêt afin qu'elles sédimentent de manière stochastique sur la surface par gravité. Ce sont généralement

les CMLV qui sontensemencées en premières afin d'obtenir la couche intermédiaire. Celles-ci sont ensuite mise en culture pour leur permettre de proliférer et migrer à l'intérieur de la structure, ce qui dépendra de la porosité de l'échafaudage²⁵⁹. Une fois qu'elles se sont développées, des cellules endothéliales ou des fibroblastes sontensemencées à leur tour selon le même procédé.

Des méthodes alternatives permettant d'améliorer l'ensemencement cellulaire ont été développées. Ces méthodes correspondent à un ensemencement dynamique et particulièrement *via* un système de rotation²⁶⁰. Cette technique utilise la force centrifuge pour l'adhésion des cellules sur l'échafaudage. Dans leurs travaux, Godbey et al²⁶⁰ ont développé un rotor objet pour être placé dans une centrifugeuse de laboratoire classique de telle sorte que l'axe de rotation passe à travers la lumière centrale de l'échafaudage tubulaire. Des cellules musculaires lisses ont ainsi étéensemencées à une vitesse de 2500 tr/min à l'intérieur d'un échafaudage poreux en acide polyglycolique (PGA). Les auteurs ont démontré une plus grande efficacité d'ensemencement homogène par rapport aux techniques statiques avec 3 fois plus de cellulesensemencées sur l'échafaudage en 10 min grâce à l'ensemencement dynamique par rapport à 24h d'ensemencement statique. Néanmoins, les auteurs ont noté également un impact de cette technique de centrifugation sur la viabilité cellulaire dû à la force de centrifugation entraînant des chocs cellulaires par rapport à l'ensemencement statique qui n'engendre pas ce phénomène.

Les chercheurs Soletti et al²⁶¹ ont développé une technique d'ensemencement utilisant les effets synergiques du vide, de la force centrifuge et du flux (Figure 19A). En résumé des cellules sont injectées au centre de la structure tubulaire puis une pression sous vide est appliquée à la chambre contenant la structure, de telle sorte que les cellules soient attirées vers l'extérieur du tube, permettant ainsi d'induire de manière « forcée » un flux transmural à travers les porosités de la structure. De cette manière les cellules sont piégées à l'intérieur des porosités de la structure. De plus, la structure tourne simultanément pendant l'ensemencement afin d'augmenter l'homogénéité d'ensemencement de manière circonférentielle.

Une autre technique d'ensemencement dynamique est basée sur l'utilisation de champs magnétiques. En effet, cette approche permettrait d'ensemencer les cellules sur les parois de l'échafaudage de manière homogène mais aussi de manière plus rapide par rapport aux

techniques d'ensemencement statique ou rotative. Dans leurs travaux, Perea et al.²⁶² utilisent un électroaimant entourant un échafaudage tubulaire en collagène renfermant des cellules marquées magnétiquement (Figure 19C). En effet, les HUVEC ont été marquées *via* un anticorps Dynabeads® anti-CD31 et les CMLV ont été marquées *via* un anticorps Dynabeads® anti CD44. Une membrane de collagène a été déposée à l'intérieur d'une structure tubulaire magnétique. Cet électroaimant va attirer les cellules à travers les parois de la membrane de collagène, où elles seront ensemencées et adhérentes. Les CMLV ont démontré un temps d'adhésion de 40 minutes et les HUVEC un temps d'adhésion de 20 minutes. L'avantage de cette technique est l'ensemencement rapide des cellules sur l'échafaudage ainsi que l'intégrité morphologique des cellules, contrairement à l'ensemencement rotatif entraînant des contraintes de cisaillement murales ou encore à l'ensemencement sous vide qui engendre des contraintes de cisaillement lors du flux transmural à travers les parois de l'échafaudage²⁶³. Au cours de l'ensemencement magnétique, une force 100 fois supérieure au poids de la cellule est appliquée, ce qui reste nettement plus faible que les forces centrifuges appliquées aux cellules généralement lors de leurs cultures.

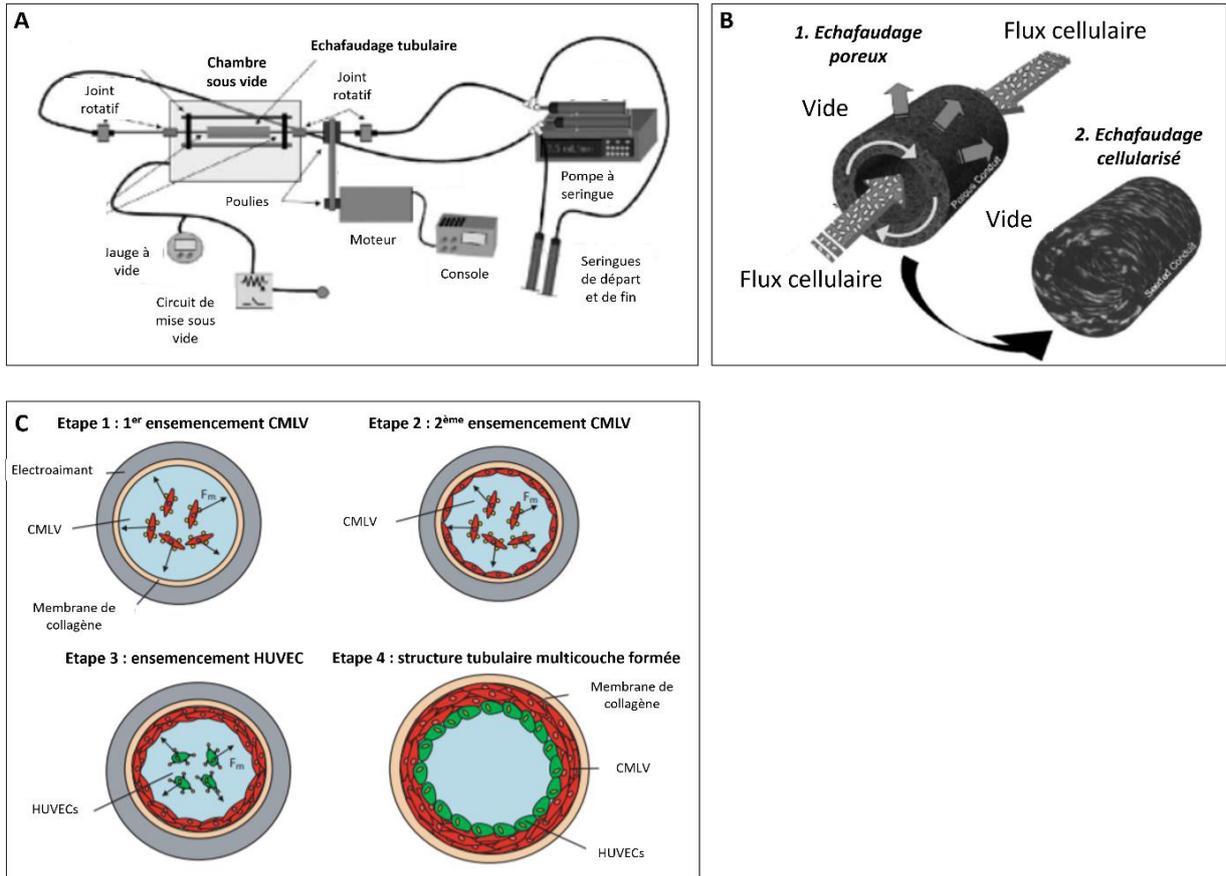


Figure 19 Représentations schématiques de plusieurs méthodes d'ensemencement cellulaire d'échafaudages développés *in vitro*. **(A)** et **(B)** Ensemencement cellulaire d'une structure tubulaire poreuse *via* un flux cellulaire interne et une mise sous vide²⁶¹. **(C)** ensemencement cellulaire *via* un procédé magnétique. Les cellules marquées magnétiquement sont injectées à l'intérieur de la structure tubulaire et un champ magnétique va les attirer sur la paroi interne de la structure²⁶².

Enfin, une des dernière approche de cellularisation d'un échafaudage est l'utilisation de la cellularisation *in vivo*. Cette méthode permet l'intégration de la structure directement dans le système hôte, ce qui permet une cellularisation rapide^{233,241,264-267}. Cependant le principal inconvénient de cette technique est traduit dans la majorité des cas par un phénomène de fibrose et de thrombose, une obstruction des pores, et enfin une lente dégradation de l'échafaudage²⁶⁸⁻²⁷⁰.

Les techniques d'ingénierie vasculaire par des approches classiques permettent donc la création de structures vasculaires récapitulant autant que possible les architectures vasculaires natives. Cependant, un des inconvénient repéré lors ces approches est le processus de fabrication généralement en plusieurs étapes, souvent réalisées sur plusieurs

jours voir plusieurs semaines et causé principalement par un temps de maturation long des différentes cellules utilisées. En effet, pour la méthode de moulage par exemple, la migration et la maturation des cellules musculaires lisses à l'intérieur de l'hydrogel doit d'abord être effective avant de pouvoir mouler la couche de fibroblastes ou de cellules endothéliales.

Pour soulever ces obstacles, les chercheurs se sont penchés sur des technologies de pointe innovantes, en particulier les méthodes de biofabrication telle que la bioimpression 3D. En effet, cette méthode s'est révélée adaptée à la création de vaisseau sanguin, de structure et composition complexe.

ii. Ingénierie macrovasculaire avancée

La bioimpression 3D : définition

L'impression 3D, ou fabrication additive, permet la création d'objets tridimensionnels par ajout de couches successives de matière guidées par des modèles de conception assistée par ordinateur (CAO)²⁷¹. La bioimpression 3D est une technique de biofabrication permettant le dépôt couche par couche de biomatériaux et de cellules avec un contrôle précis de la structure finale afin d'obtenir un tissu aux fonctions biologiques spécifiques^{144,272-275}. Il est important de distinguer la bioimpression 3D de la bioimpression. En effet, la bioimpression assistée par laser ne correspond pas à de la bioimpression tridimensionnelle étant donné la limitation nette de fabrication de structures ne pouvant excéder 100 µm de hauteur^{276,277}. Il n'est donc pas possible de réaliser des constructions morphologiquement pertinentes et complexes avec la bioimpression assistée par laser.

Le procédé de fabrication de bioimpression nécessite plusieurs étapes avant de pouvoir développer un tissu fonctionnel. Tout d'abord le modèle à bioimprimer doit être conceptualiser *via* un logiciel adapté. C'est la conception assistée par ordinateur (CAO) qui nous permet d'obtenir un fichier STL (*Standard Tessellation Language*) de notre modèle 3D. Ce fichier STL est ensuite chargé dans un logiciel de tranchage associé à l'imprimante 3D pour être paramétrer pour l'impression avec notamment la définition des hauteurs de couches, de la porosité de la structure, de la vitesse d'impression. Ce sont les paramètres de tranchage. Une fois ces paramètres appliqués, un Gcode est ainsi obtenu et correspondent aux instructions à fournir à l'imprimante pour dicter ses mouvements. L'étape d'impression peut alors être

lancée avec l'extrusion de la bioencre et la formation de l'objet 3D selon les paramètres définis précédemment.

Comme nous allons le voir nous retrouvons deux techniques de bioimpression 3D différentes : une première technologie permettant l'éjection de matière sous forme de gouttes, la bioimpression 3D par jet d'encre²⁷⁸ et une seconde technologie permettant le dépôt de matière continue *via* l'extrusion d'un filament, c'est la bioimpression 3D par micro-extrusion²⁷⁹ (Figure 20).

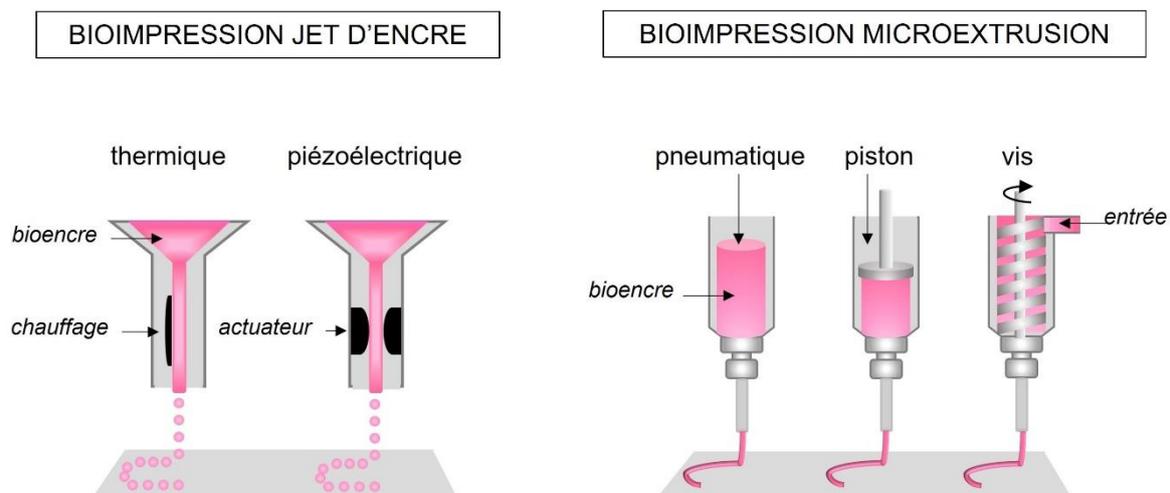


Figure 20 Représentation schématique des techniques de bioimpression 3D. **(A)** Technique de bioimpression 3D par extrusion, permettant d'extruder un filament de bioencre, soit par une pression pneumatique, soit par une pression mécanique *via* l'utilisation d'un piston ou une vis. **(B)** Bioimpression 3D par jet d'encre, permettant l'éjection de gouttelettes de bioencre *via* un procédé thermique ou piézoélectrique.

La bioimpression 3D par jet d'encre

La bioimpression 3D par jet d'encre est une technique sans contact où des gouttelettes de picolitres de bioencres sont éjectées sur un substrat²⁸⁰. Cette technologie permet l'éjection d'une bioencre sous forme de gouttes en s'appuyant sur des phénomènes physiques de mécaniques des fluides. Pour se faire, la bioencre est chargée dans une seringue et une tension de surface est appliquée au niveau de la sortie, permettant à la bioencre de rester dans la seringue. La gouttelette de bioencre est ensuite formée et éjectée grâce à deux méthodes mécaniques différentes : thermique ou piézoélectrique. La méthode thermique correspond à l'utilisation d'un générateur de chaleur qui augmente la température localement au niveau de la seringue de bioencre. Ce chauffage va engendrer la formation d'une bulle qui se dilate progressivement et va alors permettre l'éjection de gouttes. Concernant la méthode

piézoélectrique, un actionneur va générer une impulsion à l'intérieur de la seringue, qui va permettre l'éjection de petites gouttelettes.

Les avantages de cette technologie se concentrent sur une facilité de mise en place, la possibilité d'utiliser plusieurs seringues d'impression tout en gardant une résolution d'impression relativement élevée entre 20 et 200 μm grâce aux volumes de l'ordre du picolitre. Cependant, son utilisation est limitée à celle de biomatériaux dont la viscosité est faible et comprise entre 3,5 et 12 $\text{mPa}\cdot\text{s}^{-1}$ (pour comparaison, la viscosité de l'eau est de 1 $\text{mPa}\cdot\text{s}^{-1}$)²⁸¹. Les diamètres des buses d'extrusion étant compris entre 35 et 75 μm un problème récurant de bouchage est aussi rencontré, notamment lors de l'utilisation de concentration cellulaire trop élevée. Une limitation à ce niveau est donc remarquée.

La bioimpression 3D par extrusion

La bioimpression 3D repose sur l'extrusion d'un filament continu de bioencre composée de biomatériaux spécifiques et de cellules^{282,283}. Cette bioencre est chargée dans une seringue d'impression et est ensuite extrudée à travers une buse de diamètre contrôlé pour former un filament de matière. Ce filament se dépose alors sur un support solide. Le principe est assez similaire à celui de l'impression FDM (Fused Deposition Modelling) où le filament thermoplastique passe à travers une buse chauffée à la température de fusion du thermoplastique et va se déposer sur un plateau pour former couche après couche un objet 3D. Pour la bioextrusion, à la place du filament plastique, une bioencre est extrudée. Celle-ci se compose de biomatériaux et de cellules. Il existe deux systèmes de distribution de bioencre : un système mécanique ou pneumatique où la quantité de bioencre extrudée peut être ajustée en contrôlant le niveau de pression appliquée dans la seringue ou *via* le déplacement du piston de la pompe mécanique respectivement.

Un des avantages de la bioimpression 3D par extrusion est la grande versatilité de biomatériaux pouvant être formulés pour constituer une bioencre avec des viscosités comprises entre 30 et $6\cdot 10^7$ $\text{mPa}\cdot\text{s}^{-1}$ ^{284,285}. Il est aussi possible d'intégrer plusieurs seringues d'impression au système, permettant d'utiliser simultanément diverses seringues composées de plusieurs matériaux dans un même objet 3D et/ou plusieurs types cellulaires. L'objet 3D bioimprimé peut être, ou non, consolidé *via* des réactions chimiques, enzymatiques ou encore grâce à des changements de température. Cette étape de consolidation est bien sûr dépendante des biomatériaux utilisés.

La bioextrusion permet d'intégrer des concentrations cellulaires élevées de l'ordre de plusieurs millions de cellules par millilitre de bioencre²⁸⁶. La densité cellulaire est un facteur important à prendre en considération. En effet, si celle-ci est trop faible, le tissu ne sera pas viable car les cellules, trop éloignées les unes des autres, n'arriveront pas à communiquer et donc à proliférer. Si la densité est au contraire trop élevée, les cellules vont subir un important stress au moment de l'impression car étant très comprimées les unes aux autres, une mort cellulaire sera constatée post-impression. La densité cellulaire dans la bioencre doit donc être définie et optimisée.

Un autre avantage de la bioextrusion est la rapidité de cette technique qui permet une fabrication d'objets 3D à une vitesse de 10 mm³/min en moyenne²⁷⁹. Enfin il a été démontré que la bioimpression 3D par extrusion permet une viabilité cellulaire de l'ordre de 90 % en moyenne²⁸⁷. Cette viabilité va cependant être dépendante de plusieurs facteurs : le choix des biomatériaux composant la bioencre, leurs variations de viscosité lorsqu'un cisaillement est exercé dans la seringue d'impression pour extruder la bioencre, la taille et la géométrie de l'aiguille à travers laquelle la bioencre va être extrudée, la vitesse de bioimpression, la densité cellulaire, le procédé de consolidation de cette bioencre ainsi que les conditions de maturation. Tous ces facteurs sont à prendre en compte et sont essentiels pour la réussite de création d'un objet 3D. La caractérisation des propriétés d'une bioencre représente donc un réel travail de recherche pré-impression.

Les principales différences rencontrées entre la bioimpression 3D par jet d'encre et la bioimpression 3D par extrusion sont résumées dans le Tableau 1.

Tableau 1 Principales différences entre la technologie de bioimpression 3D par jet d'encre et la technologie de bioimpression 3D par extrusion.

	BIOIMPRESSION JET D'ENCRE ^{278,288}	BIOIMPRESSION PAR EXTRUSION ^{279,289}
PROCEDE	Ejection de gouttelettes de bioencre <i>via</i> un mécanisme	Extrusion d'un filament continue de bioencre <i>via</i> un mécanisme de

	thermique (bulle) ou piézoélectrique (impulsion)	pression pneumatique ou mécanique (piston ou vis sans fin)
RESOLUTION DE FABRICATION	5à à 300 μm (taille gouttelettes)	200 μm (diamètre filament)
VISCOSITE DES BIOMATERIAUX	Faibles viscosité 3,5 à 12 $\text{mPa}\cdot\text{s}^{-1}$	Large gamme de viscosité 30 à 1.10^7 $\text{mPa}\cdot\text{s}^{-1}$
CONCENTRATION CELLULAIRE	Inférieure à 1.10^6 cellules/mL de bioencres	Jusqu'à plusieurs millions de cellules/mL
VIABILITE CELLULAIRE	Jusqu'à 80 %	Jusqu'à 90 % ²⁸⁷
VITESSE D'IMPRESSION	1 à 10 000 gouttes/s	10 mm^3/min
AVANTAGES	Facilité de mise en place Objets 3D de haute résolution	Large gamme de biomatériaux Grande quantité de cellules à utiliser Procédé rapide
INCONVENIENTS	Stress cellulaire Bouchage de l'aiguille (biomatériaux trop visqueux ou trop de cellules)	Précision de localisation cellulaire plus faible Maitrise optimale des propriétés (biomatériaux, densité cellulaire, imprimabilité, consolidation...)

La bioimpression 3D par extrusion est la technique la plus utilisée en bioimpression. Nous allons alors présenter les différentes techniques de biofabrications macrovasculaires issues de cette technologie. Nous décrirons notamment le développement de structures tubulaires cellularisées par bioimpression 3D directe, par bioimpression 3D suivant la méthode Kenzan, par bioimpression 3D coaxiale, par bioimpression sur support rotatif, par bioimpression 3D dans un hydrogel de microparticules de gélatine et enfin une technique de biofabrication par bioimpression 4D, une évolution de la bioimpression 3D.

Les différentes techniques de biofabrication macrovasculaire

L'ingénierie tissulaire vasculaire a trouvé de nombreux avantages dans cette technologie de bioimpression 3D par rapport aux méthodes plus conventionnelles de moulage, de feuillets cellulaires ou encore de création d'échafaudages par électrofilage, que nous avons cités précédemment. Et plus particulièrement, l'ingénierie vasculaire s'est intéressée à la méthode de bioimpression 3D par extrusion pour concevoir des tissus de taille centimétrique et de composition complexe. De cette technologie ont ensuite émergé plusieurs adaptations : la bioimpression 3D co-axiale, bioimpression 3D dans un support d'hydrogel, la bioimpression par la méthode Kenzan et la bioimpression sur un support rotatif.

La bioimpression 3D directe

Cette méthode correspond à la bioimpression d'une structure tubulaire directement, sans utilisation d'un échafaudage. Dans leur travaux, Tan et Yeong²⁹⁰ ont bioimprimé une structure tubulaire grâce à l'utilisation d'une bioencre en alginate de concentration 3 % (m/v). Ils ont imprimé successivement une couche d'alginate puis une couche de CaCl₂, jouant ainsi le rôle de solution de consolidation au fur et à mesure de l'impression. Une structure de 15 mm de hauteur a ainsi été imprimée. Cependant, comme nous pouvons le voir sur la Figure 21, cette approche nécessite des optimisations pour limiter la perte de fidélité de l'objet 3D à construire.

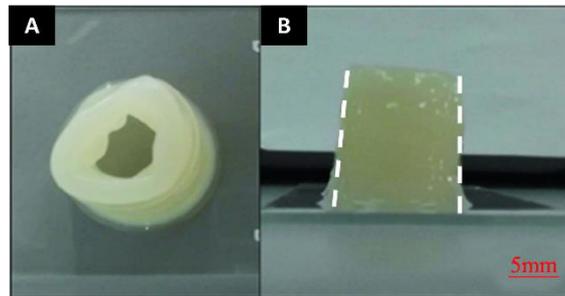


Figure 21 Biofabrication d'une structure tubulaire par bioimpression 3D directe, sans support²⁹⁰.

Une autre stratégie de bioimpression 3D directe est la formation d'une structure tubulaire, non pas de manière verticale, mais de manière horizontale. Dans leur étude, Norotte et al²⁹¹ utilisent une bioencre d'agarose pour « orienter » la structure à bioimprimer et des sphéroïdes qui formeront la structure vasculaire. Pour assembler ces sphéroïdes, des filaments d'agarose sont imprimés de manière horizontale pour définir ainsi la topologie de la

structure. Les sphéroïdes sont ainsi déposées sur les filaments d'agarose et ainsi de suite jusqu'à ce qu'une structure tubulaire complète soit formée par les sphéroïdes (Figure 22).

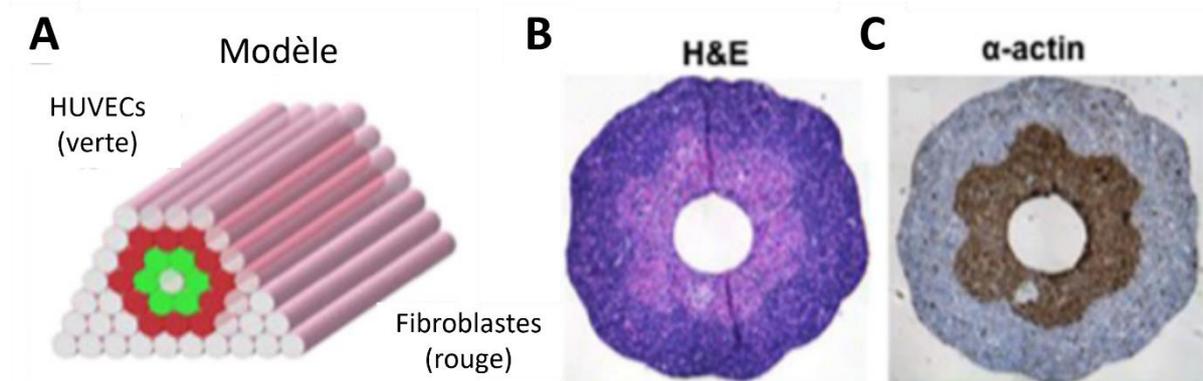


Figure 22 Biofabrication d'une structure tubulaire par bioimpression 3D directe selon une orientation horizontale²⁹¹. **(A)** Utilisation de filaments d'agarose pour créer le « moule » tubulaire permettant de déposer par la suite les sphéroïdes d'HUVEC (verte) et de fibroblastes (rouge) et de les renfermer dans cette structure. **(B)** Caractérisation histologique par marquage à l'hématoxyline et l'éosine. **(C)** Caractérisation histologique par marquage de l'actine.

Ce modèle de bioimpression permet un contrôle du positionnement cellulaire et de l'architecture vasculaire. Cependant, l'utilisation de sphéroïdes comme bloc de construction nécessite la préparation de grandes quantités de sphéroïdes (supérieure à 1000) pour pouvoir créer des structures vasculaires plus grandes et plus complexes et de ce fait une augmentation de ce temps de préfabrication. De plus, les auteurs positionnent les sphéroïdes de manière manuelle dans la structure d'agarose, ce qui peut engendrer des problèmes de stérilité.

La bioimpression par la méthode Kenzan

Cette méthode de bioimpression, développée au Japon en 2010²⁹² et dont une bioimprimante, Regenova®, a été spécialement conçue pour cette technique, utilise une matrice de microaiguilles comme support temporaire à la bioencres pour aboutir à la formation d'une structure tubulaire (Figure 23). Pour ce faire, des sphéroïdes sont développées puis elles sont empilées les unes sur les autres sur les microaiguilles puis elles sont mises en culture jusqu'à ce qu'elles fusionnent ensemble. Lorsque les cellules réussissent à supporter leur propre structure, les microaiguilles sont retirées et une structure tubulaire est ainsi obtenue. Les microaiguilles, appelées Kenzans, sont fabriquées en acier inoxydable et possèdent un diamètre de 160 μm . Elles sont placées à des distances respectives de 500 μm . De ce fait, pour

entrer en contact, les sphéroïdes doivent posséder un diamètre compris en 400 et 600 μm ce qui représente des agrégats d'environ 20 000 cellules selon le type cellulaire.

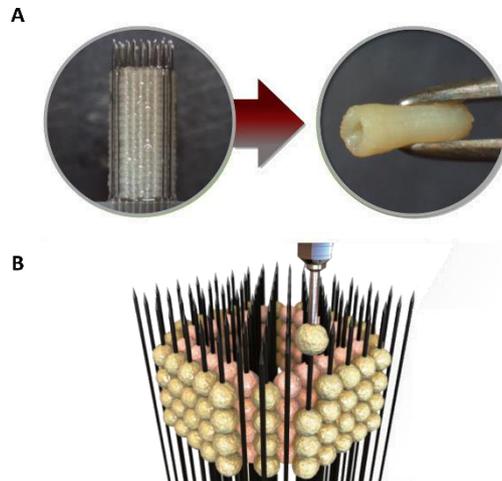


Figure 23 Biofabrication d'une structure tubulaire par la méthode de bioimpression Kenzan²⁹³. **(A)** Image du système de microaiguilles permettant l'empilement de centaines de sphéroïdes puis image de leurs fusions pour développer une structure tubulaire. **(B)** Représentation schématique du procédé de bioimpression des sphéroïdes sur les microaiguilles Kenzan.

L'utilisation de sphéroïdes en grande quantité pour ces modèles de bioimpression Kenzan (> 1000 pour des structures vasculaires complexes), engendre un temps de biofabrication plus long qu'avec des méthodes de bioimpression standard utilisant les cellules directement dans la bioencore.

La bioimpression 3D par extrusion coaxiale

Une évolution de la bioimpression 3D par extrusion est la bioimpression 3D par extrusion coaxiale²⁹⁴⁻²⁹⁶. Cette technologie peut être définie comme toute méthode d'extrusion qui dépose simultanément deux ou plusieurs flux d'écoulement les uns à l'intérieur des autres grâce à l'utilisation d'une buse spécifique²⁹⁷. Schématiquement il s'agit d'une buse à l'intérieur d'une autre buse. Cette méthode permet « d'envelopper » une bioencore dans une autre.

En réalité, l'émergence de l'extrusion co-axiale remonte à plus de 120 ans. Elle a été développée par J.F. Cooley, grâce à la méthode d'électrofilage, qui comme nous l'avons défini précédemment, permet l'extrusion de nanofilaments de polymère à travers une buse co-

axiale²⁹⁸. L'utilisation de cette buse co-axiale permettait de maintenir la présence du solvant autour de la buse d'extrusion du polymère afin d'éviter son colmatage.

Ce système d'extrusion coaxiale est notamment utilisé à partir de 1930 pour la fabrication de la soie artificielle de vers à soie²⁹⁹. Cependant, ce n'est qu'à partir des années 1980 que l'extrusion co-axiale voit des possibles applications utilisant des cellules avec notamment pour objectif d'utiliser cette technique pour encapsuler les cellules et réduire ainsi la contrainte de cisaillement qui leur est appliquée lors de leur extrusion^{300,301}. C'est seulement en 2011, neuf ans après la première étude utilisant la bioimpression 3D par extrusion³⁰², qu'un véritable dispositif de bioimpression co-axiale voit le jour³⁰³. Les matériaux utilisés dans cette étude étaient un cœur d'alginate et une gaine de collagène. L'utilisation de deux biomatériaux différents permet à l'objet 3D ainsi formé de posséder les avantages mécaniques de l'alginate mais aussi les avantages de biocompatibilité du collagène.

C'est en 2019 que les chercheurs Ge Gao et al. développent un vaisseau sanguin d'ingénierie tissulaire (VSIT) biomimétique grâce à l'utilisation de la bioimpression 3D par extrusion co-axiale³⁰⁴. Ce VSIT est composé d'un lumen, d'une couche interne endothéliale et d'une couche musculaire externe (Figure 24). Les biomatériaux utilisés sont composés de matrice extracellulaire dérivée de tissu vasculaire et d'alginate, ce qui permet non seulement de stimuler les fonctions cellulaires des cellules endothéliales grâce à l'apport d'un micro-environnement tissu-spécifique, mais aussi permet de fabriquer facilement un objet de géométrie tubulaire en une seule étape. Pour permettre de créer de la lumière à l'intérieur de ce vaisseau sanguin biomimétique, une solution de Pluronic F127 est extrudée dans le cœur de la buse, permet de supporter la formation du vaisseau sanguin à température ambiante puis, lorsque le vaisseau formé sera placé à 4°C, la solution de Pluronic F127 va pouvoir être lavée car devenue liquide. Le suivi de maturation cellulaire dans ce VSIT a été suivi pendant 3 semaines. Les auteurs ont démontré la formation d'un endothélium complet, une organisation des cellules musculaires lisses correcte et un maintien de la géométrie du vaisseau sanguin tout au long de la culture. Cependant la limitation principale observée est la faible résistance mécanique du VSIT avec une pression d'éclatement obtenue de 174 mmHg.

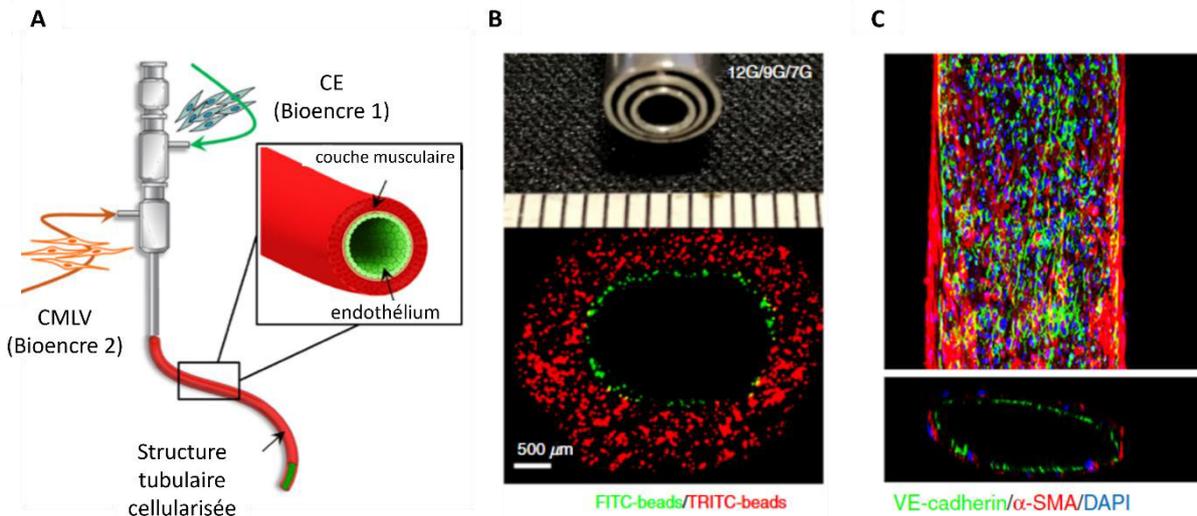


Figure 24 Biofabrication d'une structure tubulaire par bioimpression 3D coaxiale. **(A)** Représentation schématique du système de buse coaxiale permettant l'extrusion d'une 1^{ère} bioencres de cellules endothéliales (CE) à l'intérieur et d'une 2^{ème} bioencres de cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV) à l'extérieur. **(B)** Image de la buse utilisée et caractérisation par microscopie de fluorescence des deux couches cellulaires bioimprimées. **(C)** Caractérisation par microscopie de fluorescence de la paroi vasculaire³⁰⁴.

En bioimpression 3D, la technique d'extrusion co-axiale reste à ce jour la plus avancée pour créer un tissu vasculaire avec la structure complexe des trois couches de la paroi vasculaire. Cependant nous pouvons constater que la taille et l'architecture du vaisseau sanguin ainsi extrudé est limité par la taille de la buse co-axiale. De plus, il n'est pas possible de réaliser des structures vasculaires branchées avec cette technologie.

La bioimpression 3D sur support rotatif

Cette méthode de bioimpression permet la biofabrication d'une structure tubulaire grâce à l'extrusion d'une bioencres, non pas sur un support plan, mais sur un support cylindrique rotatif (Figure 25). De ce fait, au fur et à mesure de son extrusion, la bioencres va s'enrouler autour de ce support afin d'obtenir une structure tubulaire. Dans leur étude, Gao et al³⁰⁵ utilisent la méthode de bioimpression sur support rotatif couplée à l'utilisation de la bioimpression coaxiale. Pour cela ils ont formulé une bioencres à base d'alginate (entre 2 et 4 % (m/v)) mélangée à des cellules musculaires lisses vasculaires puis une autre bioencres d'alginate entre 2 et 4 % (m/v) mélangée à des fibroblastes. Une buse coaxiale a été utilisée, permettant d'extruder une solution de CaCl_2 au centre pour consolider l'alginate directement pendant la bioimpression. Ainsi la première bioencres de CMLV est extrudée sur le support rotatif puis la

seconde bioencre de fibroblastes est extrudée à son tour sur le support rotatif, sur la couche de CMLV. Les cellules endothéliales sont ensemencées par la suite à l'intérieur de la structure tubulaire. Les auteurs ont pu réaliser des structures tubulaires branchées, c'est-à-dire ajouter des ramifications à la première structure bioimprimée en collant de nouvelles structures tubulaires *via* une glue biologique à base de fibronectine.

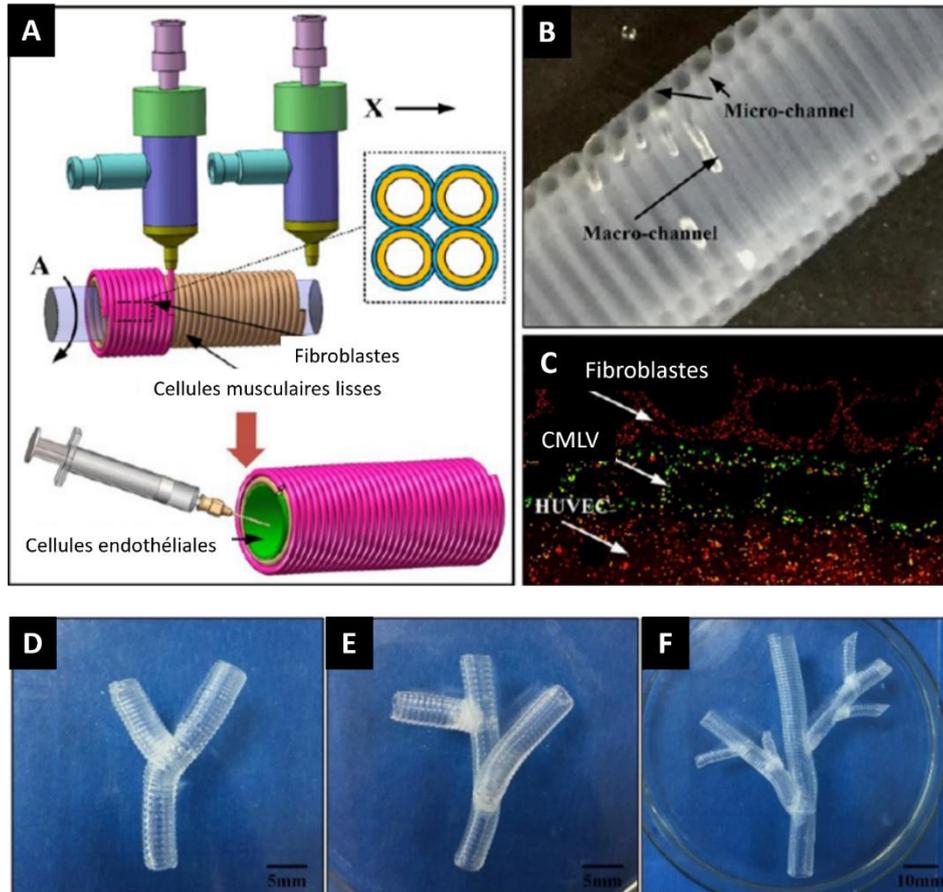


Figure 25 Biofabrication d'une structure tubulaire par bioimpression sur un support rotatif couplée à l'utilisation d'une buse coaxiale. **(A)** Schéma du principe de bioimpression. **(B)** Image d'une structure bioimprimée avec la visualisation de micro-canaux dû à l'utilisation d'une buse coaxiale. **(C)** Caractérisation par microscopie de fluorescence des différentes cellules présentes dans la structure. **(D)**, **(E)** et **(F)** Images représentant l'ajout de ramifications sur une structure tubulaire imprimée, à l'aide d'une colle de fibronectine³⁰⁵.

La bioimpression 3D supportée : extrusion dans un support d'hydrogel

Une méthode récente a vu le jour pour contourner le problème de résolution de l'objet 3D ainsi que la tenue de la bioencre pendant l'impression : la bioimpression 3D dans un support d'hydrogel, aussi appelée la bioimpression FRESH (*Freeform Reversible Embedded Support Hydrogel*)^{306,307}. Cette méthode a été développée par les chercheurs Hinton et al.¹⁴³ en 2015,

qui l'ont défini comme l'utilisation d'un bain support composé de biomatériaux thermoréversibles pour permettre le dépôt de bioencres formant des architectures 3D complexes. L'innovation clé de cette méthode est le dépôt et l'enrobage de la bioencre en cours d'impression dans un bain d'hydrogel servant de support, permettant le maintien de la structure prévue pendant le processus d'impression, et améliorant considérablement la fidélité d'impression³⁰⁷.

Le bain support est composé de microparticules de gélatine en suspension dans une solution de consolidation dépendante du biomatériau utilisé dans la composition de la bioencre. Dans leur étude, Hinton et al utilisent une bioencre d'alginate puis fabriquent le bain support en microparticules de gélatine suspendues dans une solution de calcium. C'est ce mélange qui va permettre le maintien de la bioencre lors de sa bioimpression (Figure 26). L'avantage de cette méthode est qu'elle ouvre la possibilité d'utilisation de biomatériaux très fluides voir liquides, pour la fabrication d'objets 3D, ce qui était impossible auparavant *via* la bioimpression 3D par extrusion.

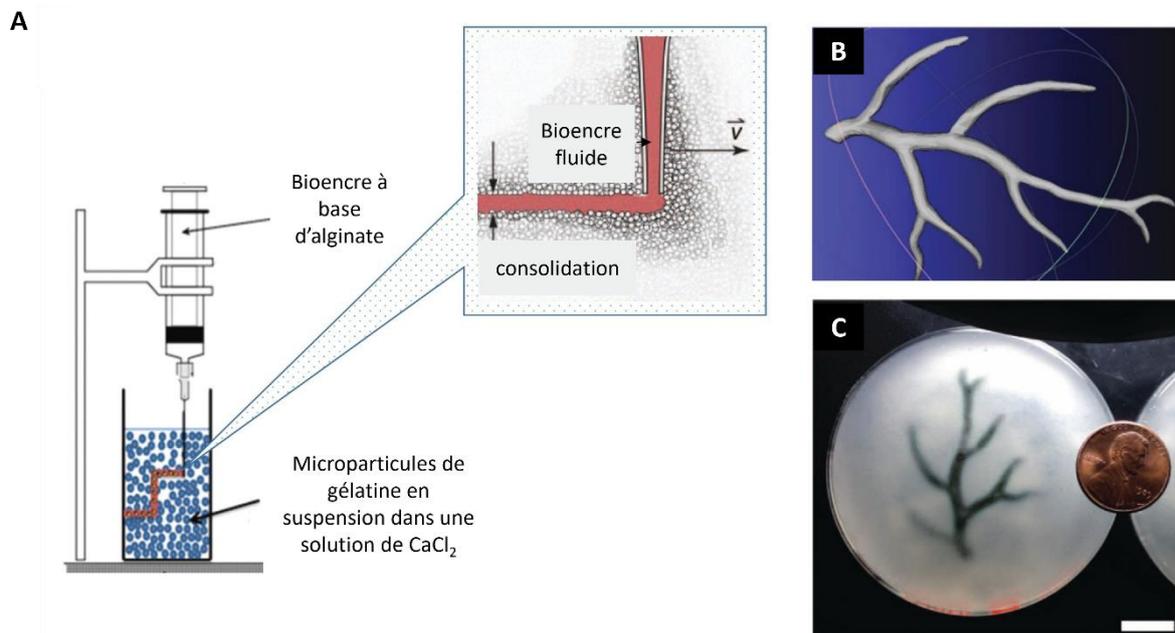


Figure 26 Principe de biofabrication d'une structure tubulaire par bioimpression 3D dans un support d'hydrogel de microparticules de gélatine. **(A)** Représentation schématique du procédé de bioimpression d'une bioencre dans un hydrogel de microparticules de gélatine. **(B)** Représentation 3D du modèle à biofabriquer. **(C)** Structure 3D bioimprimée dans l'hydrogel de microparticules de gélatine¹⁴³.

Pour résumer, la méthode FRESH permet : (i) le dépôt de biomatériaux mous à très fluides (jusqu'à 1 mPa.s), (ii) le support de ces biomatériaux fluides lors de l'impression afin d'assurer leurs maintiens, (iii) une précision de dépôt respectant la fidélité de l'objet à imprimer, et (iv) le retrait facile du support en microparticules de gélatine *via* un simple changement de température.

Tous ces avantages de la méthode de bioimpression 3D dans un support d'hydrogel fait d'elle une méthode aux capacités inégalées en termes de versatilité de viscosité de bioencres pouvant être utilisée, de résolution d'impression avec des diamètres de filament extrudés allant jusqu'à 20 μm , et de complexité géométrique 3D qui peuvent être créées.

A l'heure actuelle seules des structures composées d'une seule paroi ont été bioimprimées. Le défi de biofabrication d'une structure vasculaire multicouche reste donc persistant.

La bioimpression 3D par extrusion, grâce à ses utilisations par des approches différentes, permet de développer des structures vasculaires.

La bioimpression 4D

Une autre technique dérivée de la bioimpression 3D par extrusion est la bioimpression 4D. En tant que nouveau domaine, la classification et la définition de la bioimpression 4D ne font pas toujours l'objet d'un consensus commun.

En 2013, Skylar Tibbits, co-directeur et fondateur du *Self-Assembly Laboratory* (MIT), a tout d'abord introduit et défini le concept de l'impression 4D : « Le concept 4D a ajouté la dimension du temporelle et décrit les matériaux qui peuvent être objets par impression 3D afin qu'ils réagissent plus tard et changent de forme en réponse à un stimulus externe tel que la chaleur ou l'humidité »³⁰⁸ (Figure 27A). De même, les travaux de Jennifer Lewis sur l'impression 4D ont abouti à des architectures florales à base d'hydrogel, inspirées des systèmes botaniques, dont la structure change de morphologie au cours de son hydratation³⁰⁹ (Figure 27B).

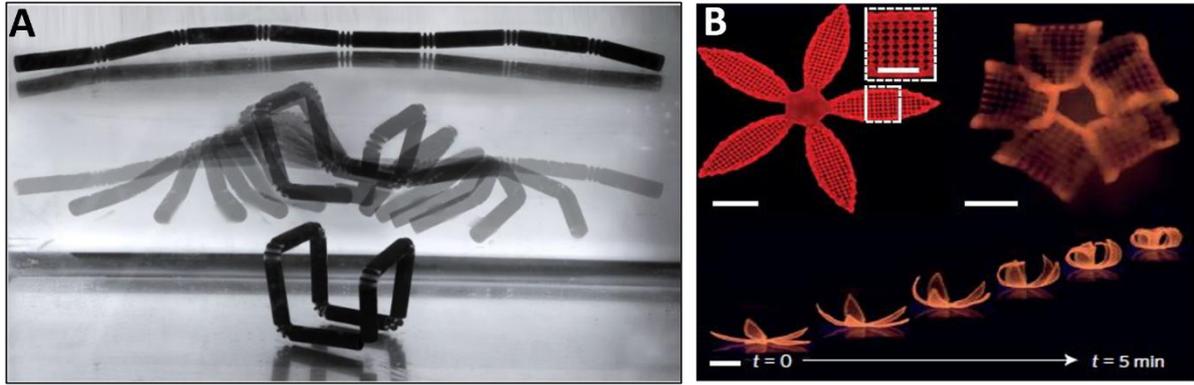


Figure 27 Impression 4D. (A) Objet auto-repliable Hilbert Gene 1 lorsqu'il est en contact avec l'eau³¹⁰. (B) Forme florale se repliant sur elle-même au contact de l'eau³⁰⁹.

Au sein de la plateforme de recherche 3d.FAB où ces travaux de thèse ont été réalisés, la définition de l'impression 4D défini par Skylar Tibbits, limitée aux objets 3D dont la géométrie n'évolue qu'en fonction du temps et de l'environnement, a été étendue. L'impression 4D permet d'ajouter dans un objet 3D, une fonction physique, chimique, biologique ou biochimique permettant une évolution dans le temps de la construction (Figure 28). Cette nouvelle définition permet d'envisager la création d'objets 3D piégeant des molécules biologiquement actives telles que des enzymes ou des anticorps, de manière organisée et à des localisations spécifiques au sein de cette bioconstruction^{311,312}.

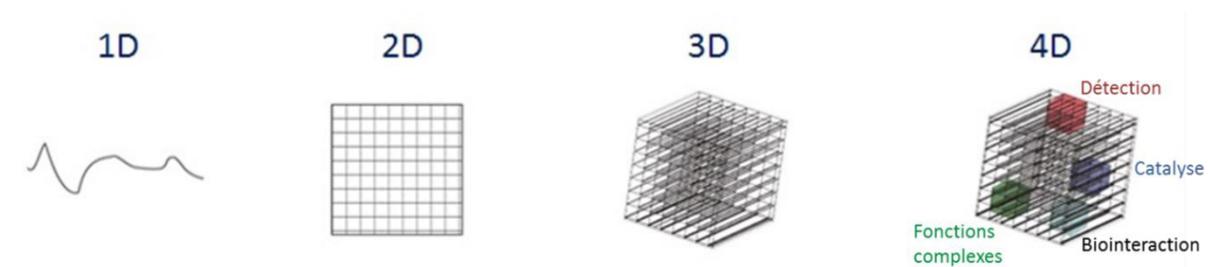


Figure 28 Concept de la 1D à la 4D. L'impression 4D définit la conception d'un objet 3D auquel de nouvelles fonctionnalités physiques, chimiques, biologiques ou biochimiques sont ajoutées³¹².

En corrélant ces définitions d'impression 4D, la bioimpression 4D favoriserait des changements dynamiques, structuraux et cellulaires au sein d'un tissu, au fil du temps, grâce à l'action de stimuli externes physiques, biologiques, chimiques ou encore biochimiques^{313,314}. La bioimpression 4D permet en fait de surmonter la nature statique de la bioimpression 3D. En ingénierie tissulaire, la biofabrication de tubes creux dotés d'une paroi complexe reste un réel

défi. L'utilisation de la technologie de bioimpression 4D permettrait de répondre à ce défi grâce à l'auto-organisation du tissu lui-même lorsqu'il est soumis à des stimuli externes. L'approche étant récente, peu de travaux ont encore été réalisés en ingénierie tissulaire vasculaire par bioimpression 4D.

Dans ses travaux, Kirillova et al³¹⁵ ont utilisé de l'alginate modifié par ajout d'un groupement méthacrylate pour le rendre photoréticulable. La bioencres chargée ou non en cellules est bioimprimée sur une surface en verre (hydrophile) ou en polystyrène (hydrophobe) dans une forme rectangulaire plane. Ce sont ces supports, par leurs propriétés de mouillage qui vont permettre de déclencher une réaction de pliage des constructions bioimprimées quand ils seront immergés dans une solution aqueuse. Après bioimpression, les objets sont photoréticulés *via* une lumière verte (moins cytotoxique pour les cellules que la lumière UV) et séchés à température ambiante pendant 1h. Les objets sont ensuite placés dans une solution de PBS ou de milieu de culture et un repliement instantané en forme de tube est observé et correspond à la réaction 4D (Figure 29). Le diamètre des tubes dépendra de l'épaisseur de couche bioimprimée, du support (verre ou PS), de la concentration en alginate et du temps de réticulation. Les auteurs décrivent ainsi des constructions tubulaires pouvant mesurer jusqu'à 20 μm de diamètre, ce qui n'est pas réalisable par des approches de bioimpression/biofabrication classiques. Cependant la structure et la viabilité cellulaire observée est restreinte à 7 jours.

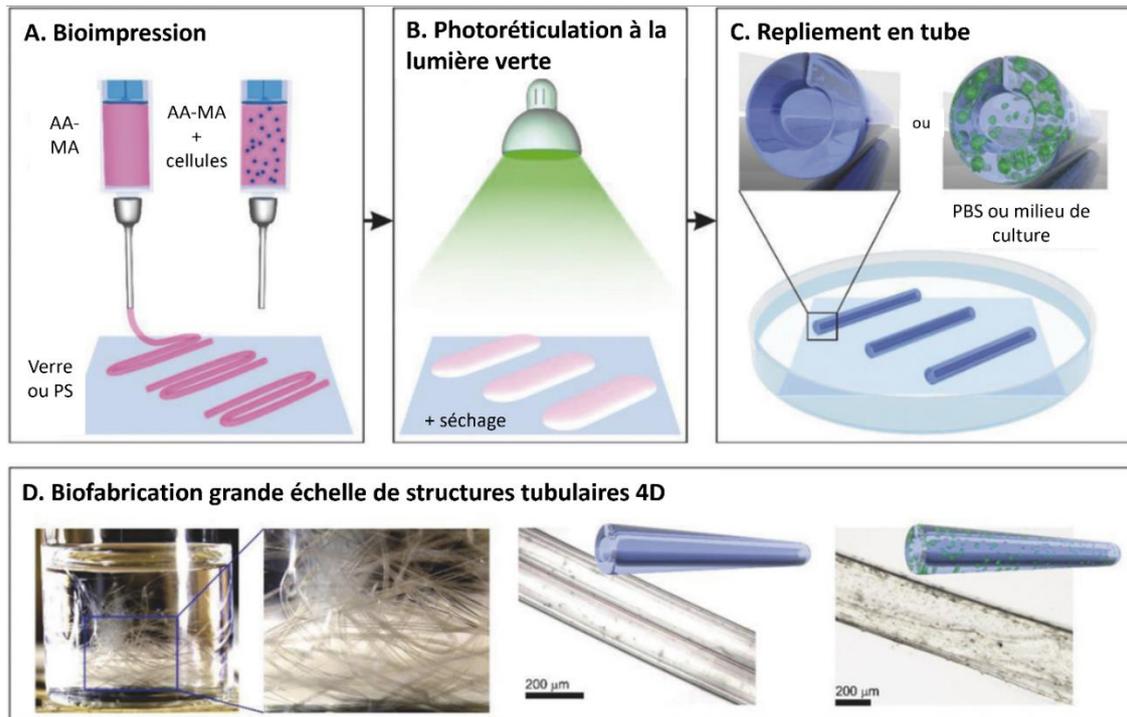


Figure 29 Représentation du procédé de bioimpression 4D d'hydrogel d'alginate méthacrylate par photoréticulation. **(A)** Procédé de bioimpression 4D de solutions de polymère AA-MA avec ou sans cellules. **(B)** Photoréticulation à la lumière verte puis séchage. **(C)** Pliage instantané en tube lors de l'immersion dans des solutions de PBS ou de milieu de culture. **(D)** Exemple de production à grande échelle de tubes 4D avec ou sans cellules suivant les applications³¹⁵.

Une autre approche de la bioimpression 4D, différente de l'assemblage en structure tubulaire par des stimuli externes, est la bioimpression 4D par auto-assemblage des tissus. Aujourd'hui, aucun résultat de recherche pour la création de vaisseaux sanguins utilisant cette approche n'a été démontré. Cependant, des travaux sur l'ingénierie tissulaire cardiaque ont été effectués et permettraient d'être transférés à l'ingénierie tissulaire vasculaire. Dans leurs travaux, Kaji et al³¹⁶ ont analysé la réponse aux stimuli chimiques d'une couche de tissu cardiaque. Ils ont notamment observé l'organisation des myocytes cardiaques pour former des jonctions communicantes entre elles. Pour cela ils ont utilisé la caféine pour activer la création de ces jonctions et l'octanol pour inhiber cette formation de manière réversible. Une stimulation plus localisée grâce à un système de micro-injection directement dans le tissu a aussi été démontrée.

Enfin, dans leur travaux de recherche, Serpooshan et al³¹⁷ ont utilisé les ondes de Faraday pour permettre l'agrégation rapide (< 10 s) de cardiomyocytes dérivés de cellules souches pluripotentes induites (hiPSC-CM) dans des constructions de fibrine créées par bioimpression

3D (Figure 30). Grâce à l'auto-organisation interne des cellules à des densités très élevées, proche de celle du myocarde (10^8 à 10^9 cellules/mL) à l'intérieur de la construction, le tissu démontre une viabilité cellulaire, une activité métabolique et une connexion intercellulaire considérablement améliorées par rapport aux constructions avec des distributions cellulaires spatiales aléatoires. Une maturation améliorée a de plus été constatée *via* l'augmentation significative des niveaux de stress contractile, de fréquence de battement et de taux de contraction-relaxation.

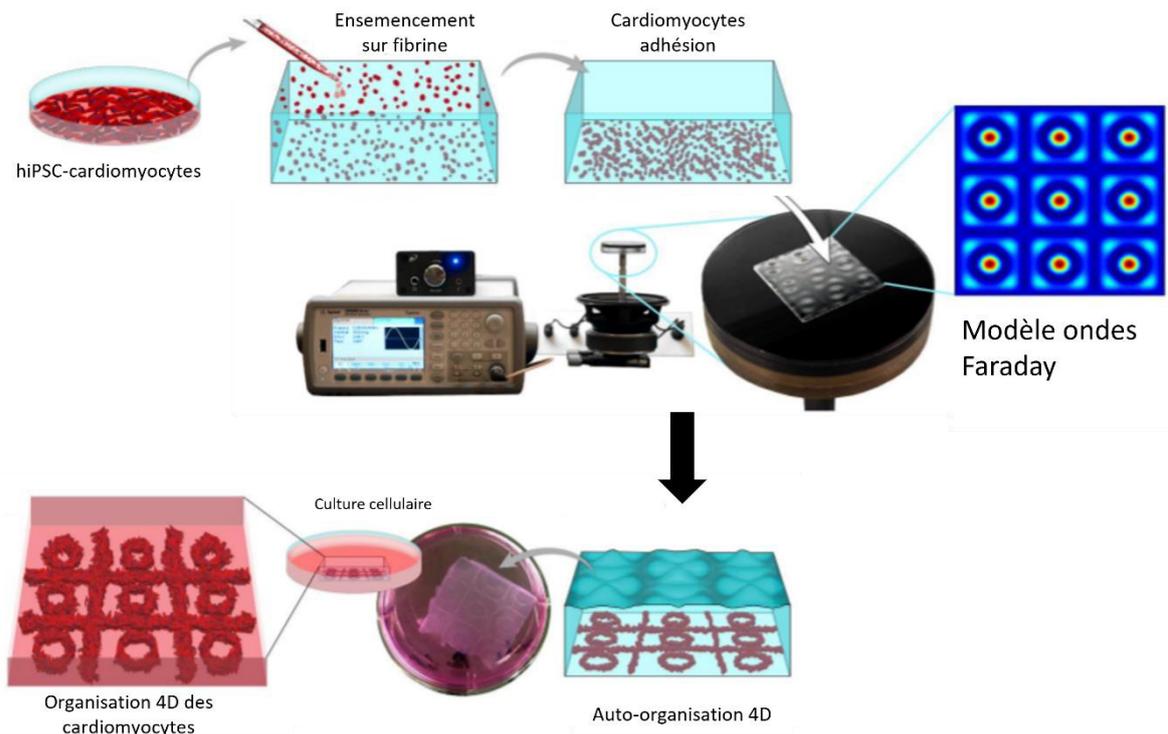


Figure 30 Auto-organisation 4D de cardiomyocytes *via* l'utilisation d'ondes Faraday. Les cardiomyocytes sont préparées et ensemencées sur un gel de fibrine. Elles sont ensuite déposées sur un système induisant des ondes Faraday selon un modèle défini. Ce stimuli 4D induit ensuite l'auto-agrégation et l'organisation des cardiomyocytes selon le modèle défini par le système Faraday³¹⁷.

En corrélation avec le défi persistant de créer une structure macrovasculaire fonctionnelle, composée de trois couches cellulaires différentes, la technique de bioimpression 4D permettrait d'induire une auto-organisation des cellules à l'intérieur d'un objet bioimprimé *via* l'action de divers stimuli externes aboutissant à la création *in vitro* de modèles vasculaires fonctionnels complexes comme schématisés sur la Figure 31.

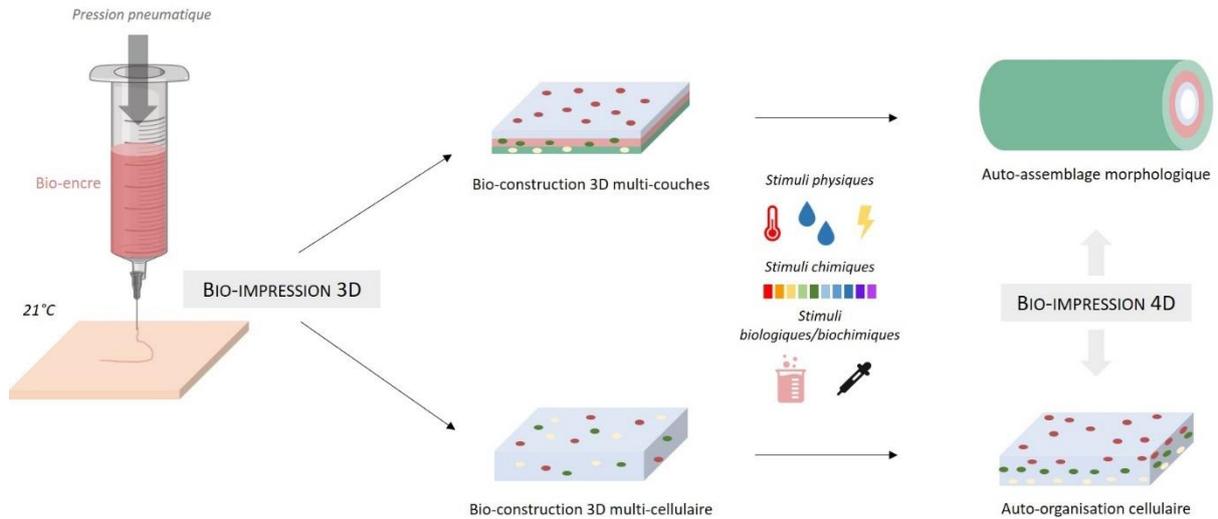


Figure 31 Représentation schématique des possibilités de bioimpression 4D. Une bioencre est chargée dans une seringue d'impression et extrudée à travers une aiguille de diamètre et de longueur définit *via* un système de pression pneumatique. L'objet 3D obtenu peut, sous l'action de stimuli, opérer un changement de forme. Ou l'objet peut suivre une approche d'auto-organisation sous l'action de stimuli externes permettant une organisation précise des cellules à l'intérieur de l'objet et donc un auto-arrangement du tissu.

Nous avons décrit les principales techniques de biofabrication appliquées à la macrovascularisation avec l'utilisation de méthodes d'ingénierie classique comme les feuillets cellulaires, le moulage ou la construction d'échafaudages par électrofilage ou issus d'espèces animales. Des techniques d'ingénierie avancée ont ensuite émergé avec notamment la bioimpression 3D par extrusion. Toutes ces techniques permettent la création de structures tubulaires cellularisées multicouches mimant les gros vaisseaux du réseau vasculaire.

Nous allons maintenant présenter les techniques d'ingénierie permettant le développement des microvascularisations, les vaisseaux sanguins de plus petits diamètres (> 6 mm) dans le réseau vasculaire. Ces microvaisseaux n'ont pas la même taille ni la même fonction que les macrovaisseaux et donc des biomatériaux ainsi que des techniques de biofabrications différentes vont être élaborées.

V.2. Ingénierie tissulaire microvasculaire

Lorsque des tissus sont lésés ou doivent être remplacés, la médecine régénérative permet alors de répondre à ces besoins. En effet, grâce à l'ingénierie tissulaire d'aujourd'hui, des substituts biologiques peuvent être biofabriqués pour remplacer ces tissus. Les principales méthodes utilisées pour réparer ces tissus sont : (i) l'injection de cellules, soit du même individu (autologue), soit d'un autre individu (allogénique), soit d'une espèce différente (xénogénique), (ii) la biofabrication d'échafaudages acellulaires et (iii) la biofabrication d'échafaudages cellularisés^{8,9}. Cependant, ces méthodes sont applicables uniquement dans le cas de tissus fins et/ou avasculaires. En effet, la peau, le cartilage, la cornée ou encore la vessie peuvent être transplantés puis rapidement vascularisés à partir du système vasculaire de l'hôte¹⁰⁻¹². Mais dans le cas de tissus plus épais, c'est-à-dire supérieurs à 1 cm, le manque de pré-vascularisation est un réel problème. Ce déficit de vascularisation est un frein aussi bien pour la transplantation avec une diminution de la survie du greffon *in vivo*, que pour la recherche expérimentale avec des modèles tissulaires *in vitro* de faible stabilité et pertinence biologique.

C'est pourquoi il est nécessaire aujourd'hui de reconstruire des tissus dotés d'une vascularisation grâce à l'utilisation de biomatériaux, de cellules et de techniques de biofabrications.

Idéalement, le système vasculaire d'ingénierie tissulaire conçu doit être transplantable ou doit stimuler la formation d'un nouveau système vasculaire sur le site de transplantation. Ces microvaisseaux créés doivent résister à des pressions physiologiques, sans fuite, non thrombogéniques et non immunogènes. Les vaisseaux sanguins de faibles diamètres présentent des besoins en ingénierie différents de ceux des macrovaisseaux. Les techniques de biofabrications que nous venons de voir précédemment ne sont pas applicables ici, en partie car le besoin n'est pas pour des tubes uniques de microvaisseaux mais pour reproduire un réseau vasculaire.

V.2.1. Source de biomatériaux

Durant la prolifération et la survie des cellules endothéliales, la matrice extracellulaire (MEC) fonctionne comme un substrat permettant leur organisation en un réseau microvasculaire mais également comme un réservoir pour les facteurs de croissance permettant la fabrication

d'une vascularisation mais aussi pour la cicatrisation et d'autres processus physiologiques³¹⁸. Ainsi l'interaction des cellules et de la matrice est un facteur très important à considérer et devra mimer la MEC naturelle. De nombreuses caractéristiques du biomatériau doivent donc être prises en compte pour reproduire l'environnement cellulaire de manière *in vitro*, telles que les propriétés mécaniques, l'adhésion cellulaire, les conditions de culture *in vitro*... Le biomatériau doit de plus présenter des structures poreuses appropriées pour permettre aux cellules endothéliales de promouvoir l'organisation vasculaire³¹⁹.

Différents biomatériaux peuvent alors être utilisés, comme les polymères synthétiques, naturels et hybrides. Concernant les polymères synthétiques biodégradables, biocompatibles et non toxiques, plusieurs ont été utilisés comme l'acide polyglycolique (PGA), acide polylactique (PLA), acide polylactique-co-glycolique (PLGA), acide poly-L-lactique (PLLA), polycaprolactone (PCL), polyéthylène glycol (PEG), poly(alcool vinylique) (PVA) et polyhydroxyalcanoates (PHA)³²⁰⁻³²⁴.

Au niveau des polymères d'origine naturelle, ou biopolymères, ils peuvent être divisés en deux catégories : les polymères à base de protéines et les polymères polysaccharidiques. Concernant les polymères à base de protéines nous pouvons retrouver le collagène, la gélatine, la fibrine, la fibronectine, l'élastine, la fibroïne de soie et le Matrigel ; concernant les polymères à base de polysaccharides nous pouvons retrouver principalement l'acide hyaluronique, l'alginate, l'agarose et le chitosane^{88,102,321-323,325-328}.

En ingénierie microvasculaire les polymères naturels seraient le choix privilégié en raison de potentiel plus élevé à mimer la matrice extracellulaire naturelle et à induire l'organisation cellulaire. Cependant pour la majorité d'entre eux, ils possèdent des propriétés mécaniques non suffisantes qui doivent être améliorées. Les principaux polymères naturels utilisés sont alors le collagène et la fibrine. La fibrine est particulièrement utilisée car elle est l'un des composants principal de la matrice provisoire dans la cicatrisation des plaies, et est largement utilisée dans de nombreuses études pour ses propriétés naturellement angiogéniques³²⁹. Pour améliorer leurs propriétés mécaniques ils peuvent être mélangés ensemble, par exemple fibrine/alginate qui forment un hydrogel rapidement par chélation de l'alginate³³⁰, ou bien combiné à des polymères synthétiques comme par exemple la fibrine/PEG³³¹, ou bien modifiés comme par exemple la gélatine méthacrylate (GelMa), qui forment un hydrogel rapidement par réticulation UV (ultra-violet)³³².

D'autres études modifient les matériaux synthétiques pour les rendre plus angiogéniques avec notamment l'ajout de fibronectine qui favorise les liaisons des cellules endothéliales avec les intégrines et induit une meilleure vascularisation³³³.

V.2.2. Techniques de biofabrication

Lorsqu'une construction est implantée, elle se vascularise lentement dans le cadre de la réponse du corps à un matériau étranger. Pour générer un système vasculaire plus rapidement, des méthodes consistent à améliorer l'échafaudage de la construction en y incorporant des facteurs de croissance pour favoriser la croissance des vaisseaux sanguins de l'hôte après implantation³³⁴. Cependant cette technique est dépendante de la réponse de l'hôte et dans le cas d'une construction grande échelle le temps nécessaire pour développer le système vasculaire poserait toujours problème³³⁵. Une autre approche consiste donc à créer un système vasculaire directement dans la construction de manière *in vitro*.

Pour cela il existe plusieurs stratégies de fabrication : (i) la stimulation de la formation de réseaux microvasculaire *in vivo* (vascularisation *in vivo*), (ii) le développement d'un réseau vasculaire *in vitro* (pré-vascularisation *in vitro*).

i. Stimulation angiogénique in vivo

Cette approche de microvascularisation par une stimulation *in vivo* consiste en l'utilisation de plusieurs approches différentes qui peuvent être cytokines³³⁶, génétiques³³⁷ ou cellulaires^{338,339}. Plusieurs modèles précliniques ont démontré des résultats positifs de stimulations angiogéniques *via* des interventions simples. Par exemple, dans leurs travaux, Takeshita et al³⁴⁰, ont réussi à stimuler cette angiogenèse *via* l'administration d'un bolus intra-artériel de facteurs de croissance endothélial vasculaire dans un modèle d'ischémie des membres postérieurs de lapin. Cependant, il n'existe pas encore de thérapies pro-angiogéniques bénéfiques pour les patients. En effet, des études utilisant le facteur FGF se sont révélées prometteuses chez des patients atteints d'ischémie dans un essai de phase II alors que pour les essais de phase III ultérieurs, aucune amélioration significative n'a été observée avec la thérapie FGF par rapport à un placebo³⁴¹. En effet le processus d'angiogenèse, la maturation et la stabilisation des nouveaux vaisseaux sanguins sont des processus complexes qui ne peuvent pas être entièrement recréés par l'administration d'un ou plusieurs facteurs angiogéniques.

Une approche de stimulation angiogénique *in vivo* consiste à créer une boucle artérioveineuse. Dans leurs travaux pour réaliser cette boucle, Lokmic et al³⁴² utilisèrent un greffon de veine fémorale interposé entre l'artère fémorale controlatérale et la veine. La boucle ainsi formée est ensuite encapsulée dans une chambre cylindrique en téflon remplie de matrice cellularisée et des cellules spécifiques au tissu à stimuler. Ces boucles artérioveineuses créent une réponse angiogénique locale avec des réseaux microvasculaires qui se développent dans la chambre (Figure 32).

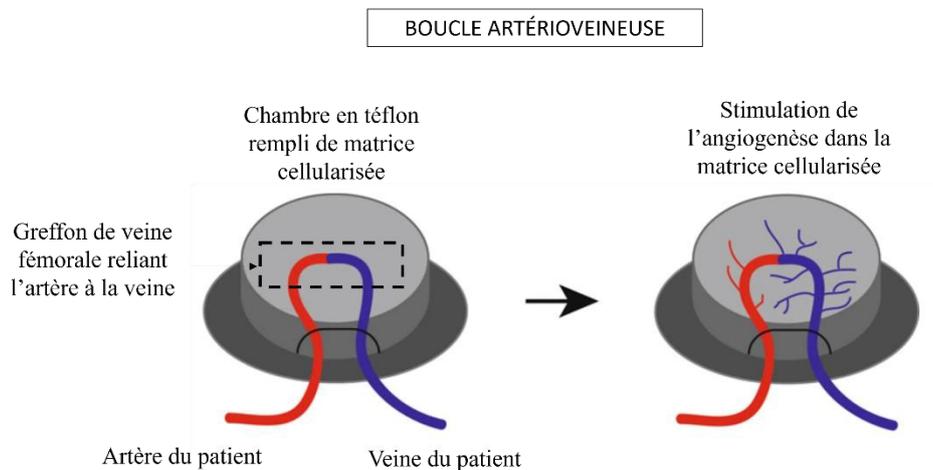


Figure 32 Représentation schématique d'une boucle artérioveineuse pour la stimulation angiogénique *in vivo*. Adapté de Chang et al³⁴³.

ii. Décellularisation et recellularisation

Cette technique repose sur la décellularisation de l'échafaudage de matrice extracellulaire de l'organe en question par des méthodes détergentes douces. Cela permet de maintenir l'architecture des membranes vasculaires intacte. Des approches de décellularisation pour de nombreux tissus ont déjà été étudiées : les poumons^{344,345}, le cœur³⁴⁶, le rein³⁴⁷ et le foie³⁴⁸. Il faut cependant s'assurer du repeuplement complet des architectures vasculaires par les cellules endothéliales autologues contribuant à la fonction barrière des vaisseaux sanguins, ce qui n'a pas encore été démontré à l'heure actuelle à l'échelle d'un tissu entier.

iii. Microvascularisation artificielle implantable

Cette approche consiste à développer une matrice de type hydrogel dans laquelle des cellules vasculaires sontensemencées pour permettre d'induire une vascularisation lors de l'implantation, plus rapide. Puis la matrice est directement implantée pour permettre aux cellules vasculaires dans la matrice artificielle de s'organiser en microvaisseaux.

Cependant, il a été démontré que les HUVEC (Human Umbilical Vascular Endothelial Cells) entraînent en apoptose lorsqu'elles étaient cultivées seules dans un hydrogel en trois dimensions³⁴⁹, rendant le processus de formation de microvaisseaux *in vitro* complexe. Cependant, lorsque ces HUVEC sont modifiées, elles ont démontré des capacités d'organisation en microvascularisation. Un exemple a été réalisé par Schechner et al³⁵⁰ qui utilisèrent des HUVEC transduites par Bcl-2, une protéine retardant l'apoptose. Un hydrogel mixte de collagène et fibronectineensemencé de ces HUVEC a été implanté chez une souris et à démontré un recrutement de cellules murales de types cellules musculaires lisses de la souris en 31 jours et une organisation en microvaisseaux au bout de 60 jours (Figure 33).

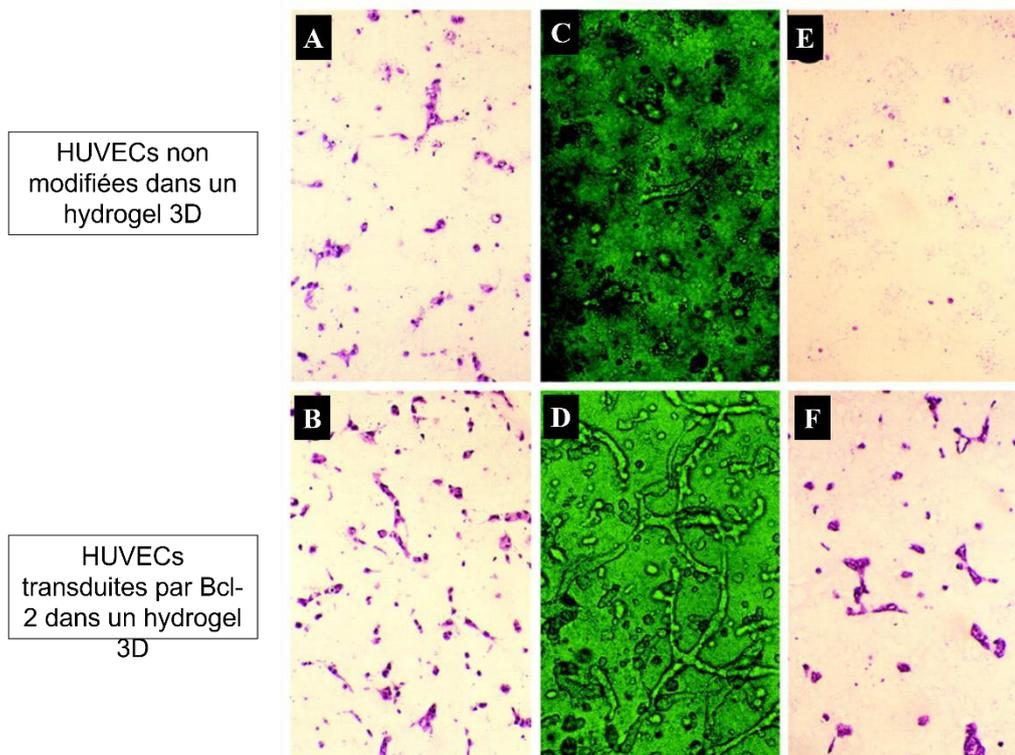


Figure 33 Comportement des HUVEC transduites par Bcl-2 dans un hydrogel 3D par rapport à des HUVEC non modifiées. Coloration H&E après 24h d'implantation dans une souris des HUVEC non modifiées (A) et des

HUVEC transduites par Bcl-2 **(B)**. Microscopie de contraste de phase des HUVEC non modifiées **(C)** et des HUVEC transduites par Bcl-2 **(D)**. Coloration H&E après 7 jours de culture dans un hydrogel 3D des HUVEC non modifiées **(E)** et des HUVEC transduites par Bcl-2 **(F)**. Grossissement x400³⁵⁰.

iv. Tissu vascularisé in vitro

Pour permettre le développement d'une microvascularisation hautement contrôlée et reproductible, des techniques de biofabrication *in vitro* sont en cours de développement. Ces applications ne sont pas encore au stade clinique mais il s'agit de développements marquants en ingénierie tissulaire vasculaire, qui permettront pour sûr de façonner les orientations de biofabrication futures.

Cependant, aujourd'hui il est clair que la biofabrication d'un tissu *in vitro* pour un devenir d'implantation devra être pré-vascularisé avant l'implantation. En effet il a été démontré que la vitesse de germination moyenne pendant l'angiogenèse dans un hydrogel de collagène était d'environ 5 $\mu\text{m}/\text{h}$ ³⁵¹. A partir de ce fait, la majeure partie des tissus à implanter dont les dimensions seront de plus d'1 mm d'épaisseur, se nécroseront avant que les microvaisseaux dérivés de l'hôte puissent perfuser ce tissu.

Pour remédier à ce problème de taille, des techniques permettant la création d'une microvascularisation dans un tissu avant son implantation, sont développées.

Les techniques de biofabrication d'un tissu pré-vascularisé *in vitro*, peuvent être classifiées en deux catégories :

- L'approche *Top-Down* ou descendante : les structures du réseau vasculaire sont préconçues dans un hydrogel, avant même d'y intégrer les cellules vasculaires.
- L'approche *Bottom-Up* ou ascendante : l'utilisation des cellules vasculaires ainsi que des facteurs angiogéniques vont stimuler l'auto-organisation cellulaire pour créer un réseau de microvaisseaux.

L'approche Top-Down

L'approche *top-down* est particulièrement utilisée en bioimpression et en microfluidique. Elle correspond à la formation d'un hydrogel mimant le tissu final, dans lequel une encre dite fugitive à base de matériaux solubles, est créée à l'intérieur. Cette encre fugitive peut ensuite

être retirée par un lavement grâce à sa solubilisation, ce qui crée ainsi des canaux perfusables. Ces canaux peuvent ensuite êtreensemencés de cellules endothéliales^{352–357}. Dans leurs travaux, Miller et al³⁵⁷ ont imprimé en 3D des filaments mimant la future architecture vasculaire en utilisant un mélange de polysaccharides (glucose, sucrose et dextran) qu'ils ont chauffé à 165°C pour le solubiliser puis ce mélange a été extrudé à 110°C pour imprimer une architecture vasculaire. Celle-ci est ensuite vitrifiée à 50°C et immergée dans une solution de PDLGA afin de créer une couche permanente sur le réseau vasculaire. Une matrice cellularisée à base de fibrine est ensuite coulée sur le réseau de polysaccharide. Ce réseau est ensuite dissout grâce à la perfusion de milieu de culture, qui laissera alors un réseau creux. La couche supplémentaire de PDLGA qui ne se dissout pas, permet au mélange de polysaccharide de s'évacuer exclusivement *via* le réseau tubulaire sans diffuser à travers la matrice de fibrine pour ne pas perturber les cellules. Une solution d'HUVEC a ensuite été perfusée à l'intérieur du réseau et laissée en culture statique (Figure 34). D'autres matériaux sacrificiels ont été utilisés dans de nombreuses études, comme le Pluronic F127®, mais le flux de travail global reste similaire^{358,359}.

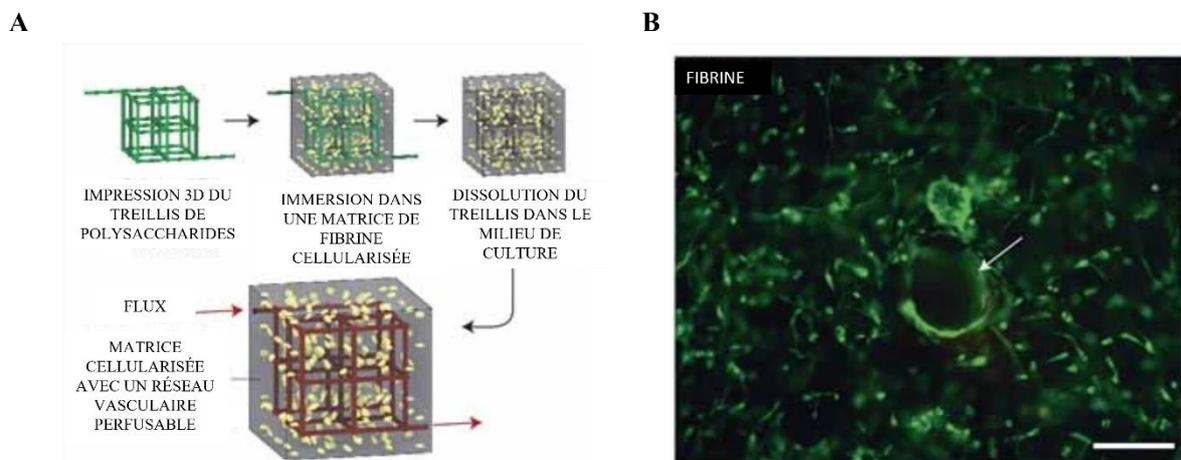


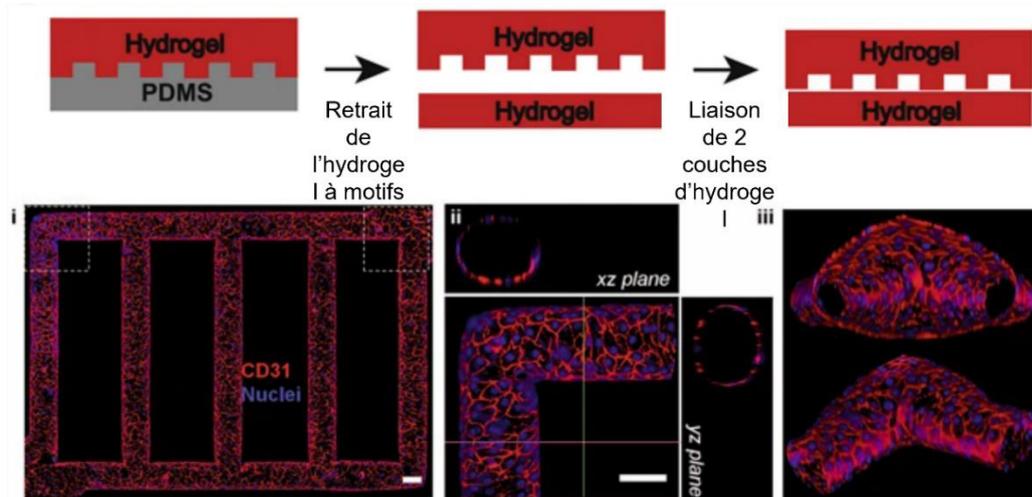
Figure 34 Impression d'un réseau vasculaire par une approche *top-down*, utilisant une encre fugitive. **(A)** représentation schématique du processus de création d'un réseau vasculaire perfusé à partir de l'utilisation d'une encre fugitive de polysaccharide, immergé dans une matrice de fibrine cellularisée. **(B)** Observation par microscopie à fluorescence après marquage à la calcéine AM d'une coupe transversale de tube cellularisé par les HUVEC. Barre d'échelle de 200 μm ³⁵⁷.

Une autre méthode d'approche descendante utilise la fabrication couche par couche d'un objet se composant de micro-canaux au fur et à mesure de son développement de manière additive. Dans la plupart des études, chacune des couches est fabriquée par lithographie puis

elles sont assemblées soit de manière mécanique³⁶⁰ soit par réticulation chimique³⁶¹. Un exemple de cette technique est apporté par Zheng et al³⁶². Ils ont dans une première étude utilisé du collagène de type I pour former le micro-réseau vasculaire. Des HUVEC ont ensuite étéensemencées directement sur l'hydrogel puis cultivées pendant 14 jours dans un milieu pro-angiogénique.

Dans une seconde étude³⁶¹, ils ont complexifié ce réseau vasculaire en utilisant un polymère synthétique dégradable, le POMaC (poly-(octaméthylène maléate (anhydride) citrate) pour développer une structure microvasculaire complexe appelées AngioChip (Figure 35B). Ces structures complexes ont été fabriquées par photoréticulation couche par couche dans des moules de PDMS (poly(diméthylsiloxane) ayant la morphologie vasculaire désirée. Les cellules d'intérêts sont ensuiteensemencées à l'intérieur des microvaisseaux.

A



B

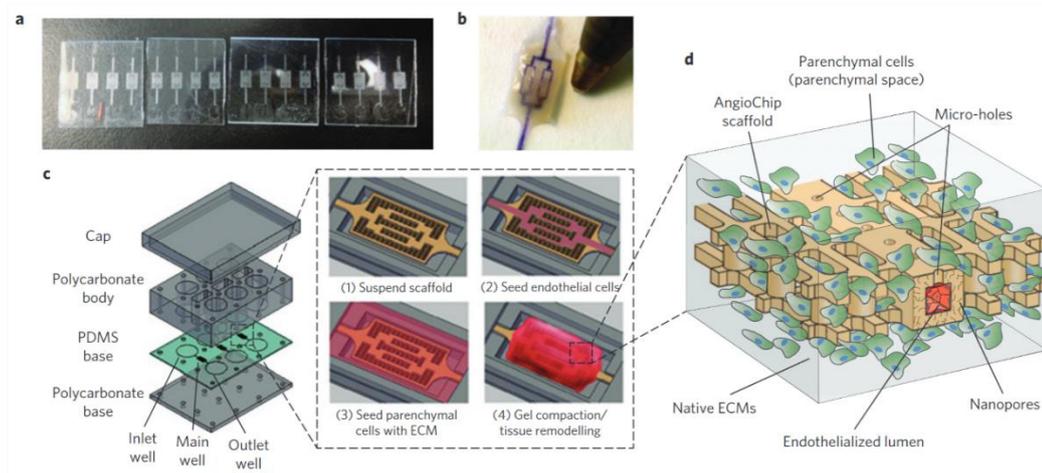


Figure 35 Représentation schématique de la fabrication couche par couche d'un dispositif microfluidique vasculaire par lithographie. **(A)** Fabrication d'un hydrogel à base de collagène de type I à micromotifs relié à une autre couche d'hydrogel plane pour former des canaux microvasculaires. Observation par microscopie confocale de la distribution³⁶². **(B)** Images de plusieurs échafaudages AngioChip (a), image d'un tissu hématique AngioChip perfusé avec un colorant (b), schéma de l'assemblage du bioréacteur et de l'assemblage du tissu vasculaire (c), schéma d'une partie du tissu AngioChip (d)³⁶¹.

Des chercheurs ont utilisé l'approche *top-down* de formation d'un réseau microvasculaire grâce à l'utilisation d'une dégradation laser³⁶³. Cette technique a été utilisée tout d'abord par Heintz et al³⁶⁴, qui ont modelé un hydrogel photodégradable de PEGDA puis une source de laser pulsé est balayée selon les configurations 3D souhaitées pour dégrader localement l'hydrogel. Les micro-canaux ainsi formés peuvent posséder des diamètres allant jusqu'à moins de 3 μm . Cependant, les auteurs ont exprimé des difficultés pour faire circuler les

HUVEC à l'intérieur de ces micro-canaux qui se bouchaient régulièrement du fait des diamètres microscopiques. Le plus petit canal qu'ils ont réussi à ensemercer mesurait alors 50 μm de diamètre (Figure 36).

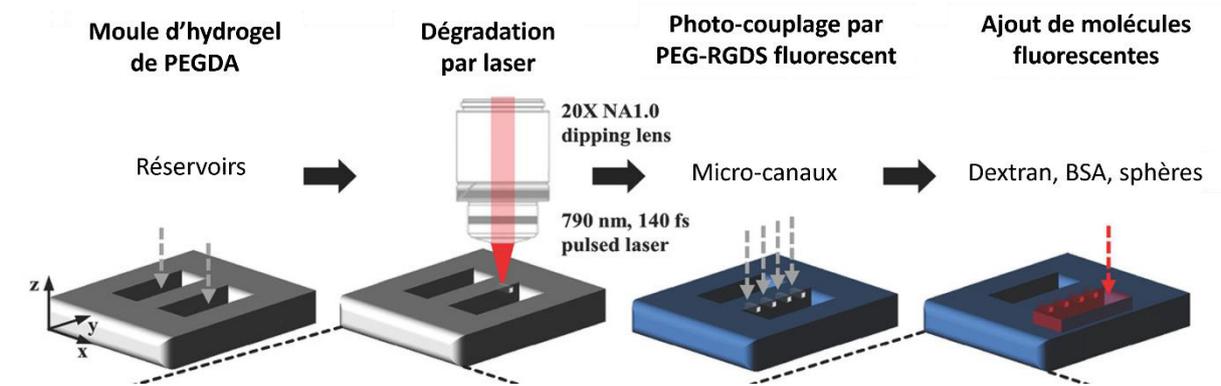


Figure 36 Représentation schématique de la fabrication de canaux microfluidiques par dégradation laser. Un hydrogel de PEGDA est photopolymérisé contre un moule de PDMS pour créer deux réservoirs. Un laser pulsé est balayé selon les configurations vasculaires 3D souhaitées pour dégrader localement l'hydrogel. L'hydrogel est marqué par fluorescence *via* un photo-couplage d'un PEG-RGDS fluorescent pour visualiser les volumes dégradés. Les réservoirs sont remplis d'une espèce fluorescente (Dextran, BSA, microsphères) ³⁶⁴.

Pour résumer, ces différentes approches *Top-Down* pour le développement d'une microvascularisation sont intéressantes pour la large gamme cellulaire pouvant êtreensemencées dans la matrice formée autour du réseau vasculaire (si la matrice est à base de biomatériaux). Cependant, elle est limitante de par l'architecture vasculaire préétabli, ne pouvant pas s'adapter par exemple à une croissance tissulaire. Cette architecture préétabli induit de plus un manque de résolution pour recréer les réseaux vasculaires très tortueux et denses formés *in vivo*.

Pour essayer de contourner ces limitations, des approches *bottom-up* basées sur l'auto-organisation des cellules en microvascularisations, ont été développées.

L'approche *bottom-Up*

La difficulté d'utiliser l'approche *top-down*, c'est-à-dire l'utilisation de cellules vasculaires directementensemencées dans un échafaudage développé *in vitro*, est la détermination des conditions de culture. En effet, des signaux mécaniques et biochimiques devraient permettre

au tissu de se développer dans des conditions optimales à mesure que le biomatériau utilisé pour la biofabrication de l'échafaudage se dégrade. Ces approches ascendantes reposent donc sur l'encouragement des cellules à recréer les mécanismes physiologiques de la formation de nouveaux vaisseaux qui se produisent pendant le développement et les événements de régénération tissulaire tels que la cicatrisation des plaies³⁶⁵. Cependant, comme nous avons vu précédemment, lorsque les HUVEC sont ensemencées seules, sans apport exogène de facteurs angiogéniques dans un hydrogel 3D, elles subissent rapidement une apoptose³⁵⁰. Il s'agit donc de trouver des solutions permettant aux cellules endothéliales de se développer dans un hydrogel 3D de manière physiologique pour mimer les événements de développement de vaisseaux sanguins.

Dans le corps humain, la néovascularisation se produit selon deux processus : la vasculogénèse, ou la formation de nouveaux vaisseaux sanguins grâce à un auto-assemblage des cellules endothéliales recrutées dans l'environnement, et l'angiogénèse, ou la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux sanguins déjà existants^{21,22,25}. Pour mimer ces événements biologiques, plusieurs méthodes ascendantes sont donc privilégiées aujourd'hui.

Vascularisation induite par l'angiogénèse

Pour reproduire le processus de l'angiogénèse *in vitro* grâce à une approche *bottom-up*, les études actuelles utilisent principalement des cellules endothéliales ensemencées directement dans des canaux cylindriques microfluidiques à l'intérieur desquels, un gradient chimique^{366,367} ou une contrainte de cisaillement des fluides^{368,369} leur est appliquée pour permettre aux cellules endothéliales d'initier une angiogénèse.

Un des exemples de travaux a été réalisé par les chercheurs Nguyen et al³⁶⁶ qui développèrent un dispositif microfluidique dans lequel un endothélium tapissant un canal cylindrique était entièrement entouré de matrice de collagène I et exposé à un gradient de facteurs angiogéniques émanant d'un canal source parallèle (Figure 37). Ils ont ainsi démontré que les cellules endothéliales migrent collectivement vers le gradient chimique. De plus ils ont identifié un cocktail synergique optimal de facteurs angiogéniques composé de MCP-, VEGF, PMA et S1P.

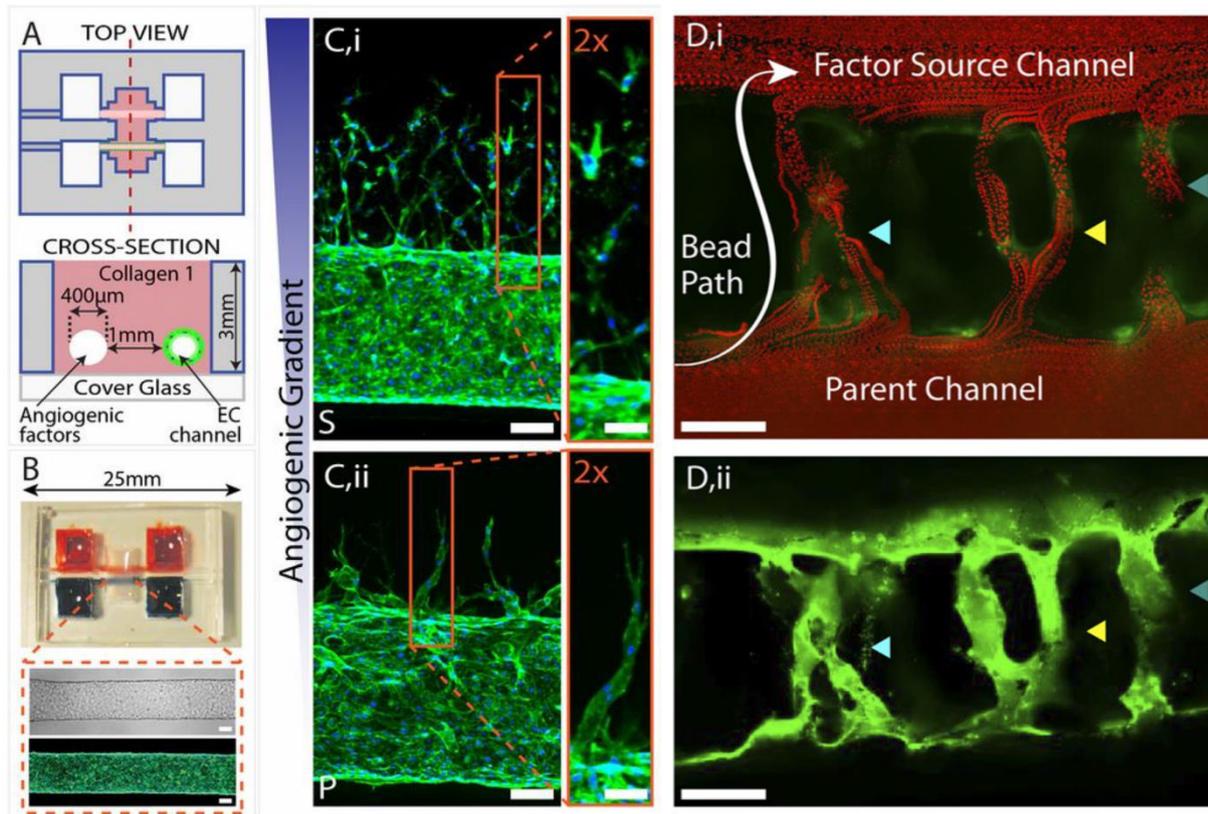


Figure 37 Modèle d'angiogenèse dans un dispositif microfluidique. **(A)** Représentation schématique du dispositif formé de deux canaux cylindriques parallèles enfermés dans une matrice de collagène I à l'intérieur d'un dispositif en PDMS connecté à des réservoirs de fluide. Un des canaux estensemencé de CE et perfusé avec du milieu de culture, l'autre canal est perfusé avec du milieu enrichi en facteurs angiogéniques. **(B)** Dispositif avec représentation par contraste de phase et par fluorescence des CE tapissant le canal. **(C)** Caractérisation par microscopie confocale à fluorescence de la germination et la migration des CE en fonction du gradient angiogénique. Barre d'échelle 50 μm. **(D)** Caractérisation des néovaisseaux développés entre les deux canaux du dispositif grâce à l'utilisation de billes fluorescentes rouge de 3 μm (i) et une caractérisation confocale par projection Z. Barre d'échelle 100 μm. ³⁶⁶

Une autre étude menée par les chercheurs Kim et al³⁶⁷ ont permis la création d'une puce microfluidique dotée de différents canaux : un canal central (C), deux canaux de cellules stromales (LO et RO) séparés par deux canaux fluidiques (LI et RI). Les différents canaux sont reliés par des micropores. L'observation de l'organisation des cellules endothéliales va être réalisée dans le canal central (Figure 38). Ce qui est intéressant dans cette étude est l'utilisation d'une co-culture de cellules endothéliales et cellules stromales, des fibroblastes primaires de poumons (LF) permettant d'observer une communication hétérotypique cellule-cellule dépendante de la diffusion, mais indépendante du contact, ce qui va permettre la progression de deux processus distincts de formation de vaisseaux sanguins : la vasculogénèse et l'angiogénèse. Les fibroblastes sont utilisés ici pour soutenir la morphogénèse des HUVEC

via la sécrétion de facteurs de croissance pro-angiogéniques et de protéines de la matrice extracellulaire. Les chercheurs ont démontré que la vasculogénèse des HUVEC dépendant de la co-culture avec les LF car les HUVEC co-cultivées seules n'ont pas réussi à former de réseaux interconnectés. La co-culture des HUVEC et des LF de manière mixte dans le canal centrale a aussi démontré le développement d'un réseau interconnecté. Concernant l'angiogénèse, ils ont observé une formation robuste de cellules de pointe et de germes angiogéniques le long du canal central qui ont ensuite guidé la croissance des germes à travers la matrice de fibrine jusqu'à ce qu'elles atteignent l'extrémité opposée du canal. Ils ont ainsi observé une traversé du canal de 700 μm de large par les cellules endothéliales en 4 jours. L'ensemencement des HUVEC seules ou l'ensemencement de fibroblastes dans les deux canaux LO et RO, n'ont pas permis aux HUVEC de se développer. Les auteurs démontrent alors que l'angiogénèse nécessite un gradient directionnel de facteurs pro-angiogéniques sécrétés par des cellules stromales. Ils ont de plus étudié le développement des HUVEC *via* un gradient angiogénique composé uniquement de VEGF. Cela a permis la germination des HUVEC mais aucune extension microvasculaire n'a été observée contrairement à celle observée avec l'utilisation de cellule stromales.

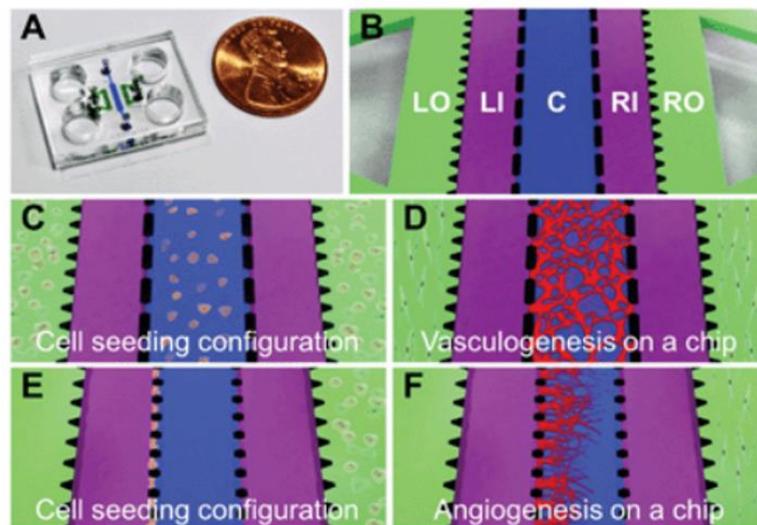


Figure 38 Représentation de la puce microfluidique et des configurations d'ensemencement cellulaire. **(A)** Image de la puce microfluidique. **(B)** Schéma des canaux microfluidiques avec le canal central en bleu (C), deux canaux fluidiques en violet (LI et RI), et deux canaux pour les cultures de cellules stromales en vert (LO et RO). **(C)** et **(D)** Les CE sont directement placées à l'intérieur d'une matrice de fibrine dans le canal central et les cellules stromales sont ensemencées à l'intérieur d'une matrice de fibrine dans les canaux LO et RO. **(E)** et **(F)**, les HUVEC sont ensemencées sur une matrice de fibrine, sur la paroi latérale du canal central et les cellules stromales sont ensemencées uniquement du côté opposé, dans une matrice de fibrine à l'intérieur du canal RO, créant un gradient de facteurs³⁶⁷.

Concernant l'étude de l'organisation endothéliale par l'utilisation d'une contrainte de fluide, les chercheurs Galie et al³⁶⁹ ont démontré que la germination induite par un flux transmurale (agit sur les jonctions cellules-cellules) et luminaire (agit sur la surface apicale de la cellule endothéliale) était déclenchée par un seuil commun de contrainte de cisaillement (~ 10 dyn/cm²) et que la vitesse et la pression appliquées n'apportaient pas de changement significatif d'organisation des cellules endothéliales (Figure 39). Ce résultat suggère que ce ne sont pas les facteurs physiques transduits par les cellules qui induisent le développement de microvaisseaux. Ils ont aussi reconnu le rôle d'un effecteur en aval de la germination induite par le flux qui est la métalloprotéinase matricielle 1. En effet, la contrainte de cisaillement appliquée régule à la hausse la sécrétion de MMP, critique dans la migration cellulaire et la germination. Enfin, les auteurs ont établi qu'un flux transmurale était nécessaire pour maintenir les microvascularisations développées par les cellules endothéliales. En effet, lorsque ce flux n'était plus actif, les réseaux vasculaires se rétractaient. Quand à elle, l'inhibition de MMP1 par du Mamaristat inhibe la formation de nouveaux microvaisseaux mais n'induit pas la rétraction des microvaisseaux déjà développés.

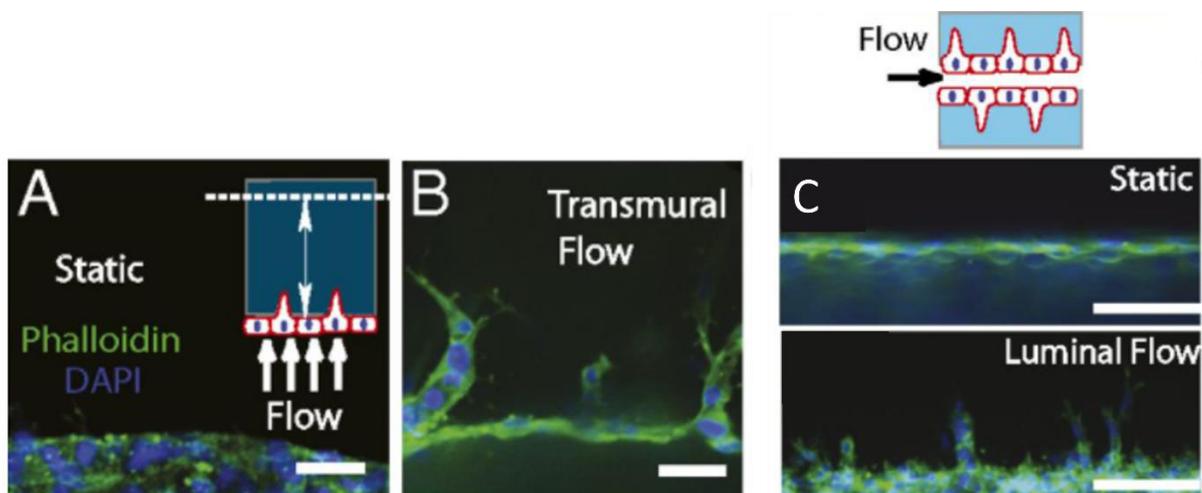


Figure 39 (A) et (B) Caractérisation par microscopie à fluorescence d'une monocouche de cellules endothéliales ensemencées sur la surface d'un gel de collagène et germée en réponse à un flux statique et à un flux transmurale. Barre d'échelle 50 μ m. **(C)** Caractérisation par microscopie à fluorescence d'une monocouche de cellules endothéliales sur un gel de collagène en réponse à un flux statique ou un flux luminaire. Barre d'échelle 100 μ m.³⁶⁹

Enfin, nous savons aujourd'hui qu'une faible tension en oxygène permettrait d'induire une vascularisation *via* la régulation du facteur inductible par l'hypoxie (HIF)³⁷⁰⁻³⁷². En effet, sous hypoxie ($pO_2 < 5\%$), le facteur transcriptionnel de l'HIF est transloqué dans le noyau et induit

ainsi l'expression de plusieurs facteurs angiogéniques, notamment le VEGF, le PDGF et le FGF^{20,373}. Cette sécrétion permet donc aux tissus hypoxiques d'être vascularisés grâce aux cellules endothéliales. Cependant, aucune étude utilisant ces dispositifs d'induction de l'angiogenèse, n'a encore étudié ce phénomène.

Vascularisation induite par la vasculogenèse

Ce type de vascularisation implique l'auto-assemblage des cellules endothéliales ensemencées directement dans une matrice d'hydrogel, en réseaux microvasculaires³⁷⁴. La première étude démontrant la capacité des cellules endothéliales à s'auto-organiser en réseaux a été décrite par Kubota et al³⁷⁵ qui ensemencèrent des cellules endothéliales sur une surface de Matrigel 2D et observèrent des structures de « type capillaire ». Depuis, beaucoup d'études se sont basées sur ce test « populaire » cependant quelque peu imprécis pour évaluer le potentiel des CE à former un réseau vasculaire. Les CE sont souvent co-cultivées avec des fibroblastes^{353,376,377}, des péricytes^{367,378} ou des cellules souches mésenchymateuses³⁷⁹ pour accélérer l'auto-assemblage et stabiliser le réseau. En effet, les cellules à proximité des cellules endothéliales permettent de réguler la fonction, la stabilité et l'intégrité de la barrière vasculaire^{28,380-382}.

Des études sur les cellules souches ont été réalisées pour la vasculogenèse par approche *bottom-up*³⁸³⁻³⁸⁵. Dans leurs travaux, les auteurs Kusuma et al³⁸³ différencient des iPSC humaines en cellules vasculaires précoces puis les ensemencent dans un hydrogel à base d'acide hyaluronique. Ils parviennent à observer, après 3 jours de culture, des structures vasculaires dotées de lumen ainsi que de péricytes autour de ces CE (Figure 40).

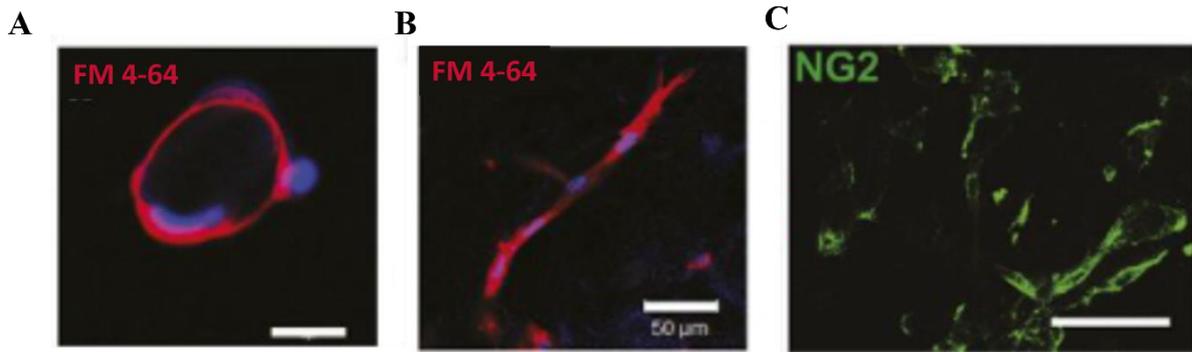


Figure 40 Caractérisation par microscopie confocale de l'organisation d'iPSC différenciées en cellules endothéliales dans un hydrogel d'acide hyaluronique. **(A)** Marquage FM 4-64 en rouge permettant de mettre en évidence l'organisation de cellules endothéliales en structures tubulaires avec une lumière (Barre d'échelle 20 μm). **(B)** Marquage FM 4-64 en rouge de structures types vasculaires (barre d'échelle 50 μm). **(C)** Marquage NG2 en vert permettant de mettre en évidence la présence de péricytes autour des structures vasculaires (Barre d'échelle 50 μm).³⁸³

Alors que l'hypoxie n'a pas été étudiée pour les processus d'angiogenèse dans l'approche *bottom-up* comme nous l'avons précisé, des études d'auto-assemblage des cellules endothéliales influencées par ce phénomène d'hypoxie, dans l'approche de vasculogenèse, ont été réalisées. En effet, bien que l'hypoxie joue un rôle central dans le développement vasculaire, personne n'avait encore simulé l'hypoxie contrôlée dans un environnement 3D. C'est pourquoi, les chercheurs Park et Gerecht³⁸⁶ ont conçu un hydrogel inductible par l'hypoxie composé : (i) de gélatine, pour ses propriétés d'adhésion cellulaire et de dégradabilité protéolytique critique dans la morphogénèse vasculaire et (ii) d'acide férulique qui permet de former alors un réseau d'hydrogel hypoxique *via* la consommation d'oxygène dans une réaction médiée par la laccase. Ainsi, les niveaux d'oxygène et les gradients dans les hydrogels peuvent être contrôlés et prédits avec précision. Ils ont ainsi démontré que les hydrogels hypoxiques guident la morphogénèse vasculaire *in vitro* *via* les HIF (facteur inductible de l'hypoxie), l'activation des MMP et de VEGF (Figure 41).

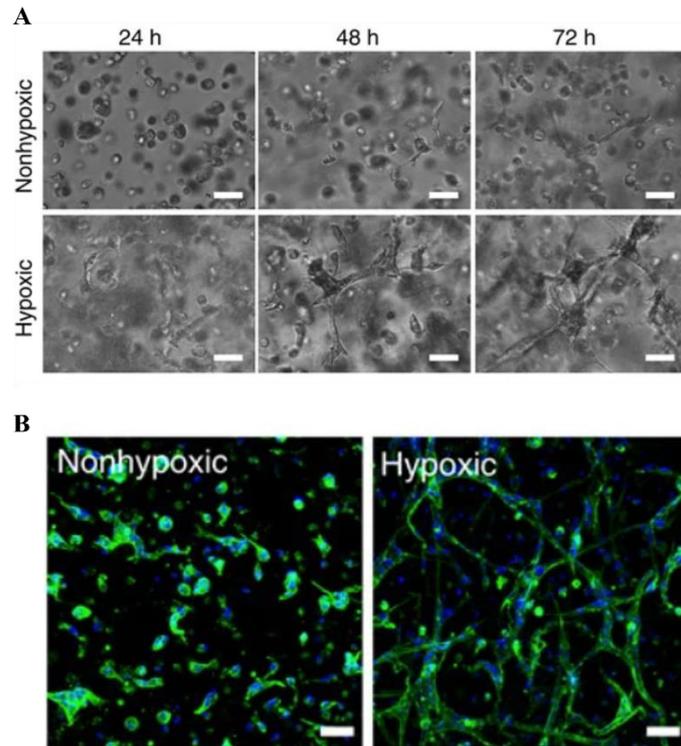


Figure 41 (A) Caractérisation par microscopie optique de structures vasculaires dans un hydrogel hypoxique pendant 3 jours de culture (Barre d'échelle 50 µm). **(B)** Caractérisation par microscopie confocale de structures vasculaires après marquage à la calcéine AM (Barre d'échelle 50 µm) ³⁸⁶.

Enfin, des études ont utilisé les données permettant l'induction de la vasculogénèse par une approche *bottom-up* pour les coupler aux études utilisant des puces microfluidiques³⁸⁷. Cela permet de créer des réseaux vasculaires *via* l'auto-organisation des cellules endothéliales puis d'étudier la fonction de la barrière vasculaire, sa perméabilité, ainsi que les jonctions cellules-cellules. Dans la majorité des études, la vasculogénèse est initiée par l'ajout de nombreux facteurs chimiques angiogéniques comme le VEGF et le FGF2^{367,376}. Dans leurs travaux, Belair et al³⁸⁸ utilisèrent des cellules endothéliales dans un dispositif microfluidique pour démontrer la capacité de ces cellules à former un réseau vasculaire connecté et perfusable *in vitro*.

Dans les stratégies visant la microvascularisation *in vivo*, par stimulation *via* l'utilisation de facteurs angiogéniques, des inconvénients sont largement détectables. En effet, ces facteurs sont associés à des demi-vies limitées en raison de leur dégradation rapide. De plus, leur surexpression pourrait induire un développement vasculaire inapproprié avec la formation de vaisseaux sanguins immatures ou instables ou même allant jusqu'au développement de

tumeurs^{322,326,389}. Un autre inconvénient est l'utilisation de doses généralement élevées de facteurs angiogéniques pour obtenir une efficacité thérapeutique et surmonter ainsi la perte due à la dégradation rapide (par exemple, 100 g d'après des études sur les petits animaux). Des solutions à l'utilisation de ces facteurs ont été proposées comme la thérapie génique, avec par exemple la transfection de cellules à ensemercer pour permettre une libération prolongée de facteurs de croissance et atteindre des concentrations idéales, l'utilisation de biomatériaux contrôlant la libération locale et lente de facteurs de croissance ou encore l'utilisation de nanoparticules comme systèmes de délivrance³⁹⁰⁻³⁹³. Cependant, ces nouvelles approches sont encore loin d'être à l'étude clinique et l'utilisation de cellules ou de biomatériaux modifiés ne reste pas l'idéal.

Les approches utilisant la pré-vascularisation *in vitro* semblent alors les plus adaptées pour le futur de la médecine régénérative. En particulier, l'approche *bottom-up* qui est considérée à l'heure actuelle comme l'approche permettant le mieux de recréer de manière *in vitro*, un tissu pré-vascularisé pour faciliter et augmenter les réussites de transplantation. Cette approche permet de plus d'augmenter les capacités des chercheurs dans leurs recherches de biologie vasculaire. Enfin, l'un des avantages de l'approche *bottom-up* partant de la vasculogenèse par rapport à l'angiogenèse est le fait d'étudier tout le mécanisme de développement d'un tissu vascularisé, c'est-à-dire son évolutivité. Cette approche permet le développement d'un réseau vasculaire suivant la seule auto-organisation des cellules endothéliales. Les structures microvasculaires ainsi obtenues laissent à penser que cette approche ascendante permettant de créer des réseaux vasculaires très denses, seront bénéfiques pour la création d'organes comme le foie, doté d'une haute densité vasculaire.

VI. La maturation des tissus vasculaires

La dernière étape pour obtenir un tissu vasculaire fonctionnel, après le choix des cellules, des biomatériaux composants la bioencore et de la technique de biofabrication, est l'étape de maturation. Cette étape commence directement après l'étape de production de la structure 3D. C'est sûrement la phase la plus complexe et certainement la plus déterminante pour l'aboutissement à un tissu fonctionnel. C'est au cours de cette étape de maturation que

les cellules vont pouvoir s'adapter à leur environnement, proliférer, produire leur propre matrice extracellulaire et établir des connexions cellule-cellule et cellule-matrice. Les conditions de maturation tissulaire doivent être le reflet, *in vitro*, de l'environnement physiologique des cellules.

VI.1. Le microenvironnement cellulaire

VI.1.1. Définition

Le microenvironnement est constitué de facteurs qui affectent directement les conditions autour d'une cellule ou d'un groupe de cellules et ont des effets directs ou indirects sur le comportement cellulaire *via* des voies physico-chimiques, biochimiques et mécano-structurales. Pour une cellule unique, le micro-environnement est composé de : (i) la matrice extracellulaire qui l'entoure, (ii) les cellules, identiques ou non, (iii) des agents bioactifs, comme les cytokines, les facteurs de croissances, les hormones, qui vont agir de manière autocrine, endocrine ou paracrine, (iv) la topographie des cellules environnantes et de la matrice et enfin (v) les forces mécaniques causées par le mouvement de l'organisme ou par le mouvement des fluides³⁹⁴. Tous ces composants du micro-environnement vont avoir un impact sur le comportement des cellules, leur adhésion, leur prolifération, leur maturation. En fonction du tissu à reproduire et donc en fonction du type cellulaire, ces composants vont avoir un rôle d'importance variable et doivent mimer le micro-environnement physiologique autant que possible. Les différentes paramètres physico-chimiques, biochimiques et mécano-structuraux ainsi que leurs facteurs associés sont résumés dans le Tableau 2.

Tableau 2 Les paramètres physico-chimiques, biochimiques et mécano-structuraux et leurs facteurs associés présents dans le micro-environnement cellulaire.

Paramètres	Facteurs associés
Physico-chimiques	Oxygène
	Température
	Flux
	Energie de surface
Biochimiques	Cytokines
	Cellules
	Hormones
	Nutriments
	pH
Mécano-structuraux	Contrainte de cisaillement
	Rigidité
	Rugosité
	Topographie
	Architecture
	Porosité

Un autre facteur important intervenant dans le micro-environnement est l'aspect tridimensionnel. La plupart des composants possèdent une orientation multi-dimensionnelle, ce qui nécessite donc de pouvoir mimer cette fonction³⁹⁵⁻³⁹⁸. Aujourd'hui, la fabrication d'objets en trois dimensions permet aux cellules de se retrouver dans des conditions favorables au développement et à la maturation. C'est pourquoi la biofabrication de structures de taille correspondant à des dimensions physiologiques de tissus et/ou organes qu'elles vont représenter, devient essentielle.

VI.1.2. Les limitations : la maturation passive

Lors des premiers travaux en ingénierie tissulaire, il fut normal de cultiver des objets 3D de manière passive, statique, c'est-à-dire dans un récipient de culture contenant du milieu de culture et placé dans un incubateur humidifié à 37°C et la présence de 5% de CO₂, sans aucun mouvement externe appliqué. Dans ce cas, la maturation se fait uniquement par simple

diffusion des gaz et des nutriments à l'intérieur de l'objet. L'oxygénation régulière de l'objet et le renouvellement des nutriments se fait alors manuellement en conditions stériles et en sortant l'objet de son incubateur thermostaté. Pour l'ingénierie de tissus à l'échelle centimétrique, cette maturation statique révèle des limitations. La diffusion des nutriments et des gaz à l'intérieur de l'objet est limitée. Il a été démontré que l'oxygène diffuse jusqu'à des distances maximales de 500 μm et plus généralement il est admis que la diffusion des gaz et des nutriments ne dépasse en moyenne pas ces 500 μm ^{371,399-404}. Cette limite de diffusion engendre un fort impact sur le micro-environnement cellulaire et donc sur la maturation tissulaire.

Grâce à la technologie de bioimpression 3D, la porosité, et donc la densité du réseau de la matrice de l'objet 3D, peut être modulable. Avant l'étape de bioimpression 3D, l'objet est conceptualisé à travers un logiciel et le paramètre de porosité, ou « remplissage » dans le langage 3D, peut être décidé en fonction de la structure du tissu à réaliser⁴⁰⁵. Ainsi des objets possédant une porosité contrôlée sont maintenant possibles et permettent la diffusion des nutriments et des gaz jusqu'aux cellules au cœur du tissu.

Même si certains paramètres du micro-environnement sont parfaitement mimés en maturation passive, un contrôle plus fin devient nécessaire. L'oxygénation du milieu, l'apport de nutriments, l'élimination des déchets, une régulation précise de la température et du pH, un flux de liquide, une contrainte de cisaillement, sont autant de critères vitaux à la création d'un modèle tissulaire 3D biologiquement pertinent. Pour réussir à recréer tous ces paramètres, des systèmes de culture dynamiques sont envisagés.

De nombreuses études ont montré que la maturation cellulaire était favorisée en système dynamique par rapport à un système statique (37°C et 5% CO₂)⁴⁰⁶⁻⁴⁰⁹. C'est pourquoi, l'utilisation de bioréacteur dans le domaine de l'ingénierie tissulaire a fait son apparition et permettrait de représenter au mieux les conditions de culture des cellules, proches de celles observées dans le corps humain.

Depuis de nombreuses années, dans le domaine de l'ingénierie vasculaire, les bioréacteurs sont utilisés pour coloniser la paroi interne de tubes en polymères synthétiques grâce au passage d'un flux contenant des cellules endothéliales⁴¹⁰. Aujourd'hui, pour faire face à la création de tissus vasculaires de plus en plus complexes, essayant de recréer les trois couches

de la paroi vasculaire, l'utilisation de bioréacteur est passée à une échelle supérieure en apportant des contrôles fins de paramètres vitaux au bon développement du tissu.

VI.2. La maturation dynamique

VI.2.1. Les bioréacteurs : définition

En fonction du domaine d'application, les bioréacteurs ne possèdent pas les mêmes définitions. En ingénierie vasculaire, les bioréacteurs peuvent être classés selon trois classes distinctes : (i) les bioréacteurs statiques, (ii) les bioréacteurs dynamiques et (iii) les bioréacteurs biomimétiques.

Un bioréacteur statique va permettre une maturation passive de la construction dans des récipients classiques de culture 2D, placés dans des incubateurs à température et humidité contrôlées. Cette catégorie de maturation statique représente la majorité des études d'ingénierie vasculaire/tissulaire. Le bioréacteur dynamique, quant à lui, est composé d'un récipient de culture équipé d'une entrée et d'une sortie permettant : soit une perfusion de solution cellulaire à l'intérieur d'un tube en polymère pour permettre son endothélialisation, soit une perfusion d'un liquide à l'intérieur d'un objet 3D déjà cellularisé, ce qui va provoquer un stress et induire une maturation⁴¹¹⁻⁴¹⁸. Ce système de bioréacteur est lui aussi placé dans un incubateur classique à température et humidité contrôlées. Enfin, le bioréacteur biomimétique va permettre de recréer les conditions environnementales du tissu *in vitro*. Il va permettre de réguler plusieurs paramètres tels que le débit du flux traversant le tissu, le pH, la température et le pourcentage d'oxygène^{85,419-422}. L'objectif de ce bioréacteur va donc être de fournir un apport suffisant de nutriments et d'oxygène aux cellules composant l'objet 3D tout en éliminant les déchets, pour permettre une viabilité et une prolifération cellulaire parfaite. Ce type de bioréacteur n'a pas besoin d'être placé dans un incubateur à température et humidité régulées pour la survie des cellules.

Deux stratégies sont utilisées en fonction des laboratoires et de leur demande pour le choix du bioréacteur idéal permettant l'amélioration du développement *in vitro* de l'objet 3D. Des bioréacteurs commerciaux peuvent être utilisés ou les bioréacteurs peuvent être conçus directement par les chercheurs pour répondre le plus parfaitement possible aux besoins de l'objet qui va être placé à l'intérieur.

VI.2.2. Les bioréacteurs : la conception

Le monde de l'ingénierie vasculaire s'est depuis longtemps axé sur l'utilisation de système de perfusion pour reproduire la contrainte subit par le vaisseau sanguin *in vivo* ainsi que pour reproduire l'endothélium, la couche interne de la paroi vasculaire.

Dans leurs travaux, Juan Wang et al.⁴²³ ont utilisé un bioréacteur commercial LumeGen® (Figure 42A). Il a été choisit pour fournir un environnement contrôlable permettant d'appliquer les conditions aortiques physiologiques sur l'objet. Le bioréacteur se compose de plusieurs parties essentielles pour la survie de l'objet : une chambre principale contenant le vaisseau sanguin, une pompe péristaltique fournissant le milieu de culture en circulation et un réservoir contenant le milieu de culture. Tout ce dispositif doit ensuite être placé dans un incubateur humidifié à température régulée (37°C, 5% CO₂).

Shigang Lin et al.⁴²⁴ utilisèrent dans leur travaux un bioréacteur commercialisé par ElectroForce®, possédant une perfusion à double pompe. Ce système de bioréacteur se compose lui aussi de plusieurs parties essentielles : un réservoir de milieu de culture avec une pompe péristaltique pour l'échange de gaz, une pompe pulsatile, une chambre BioDynamic® pour recevoir l'objet et un collecteur pulsatile pour générer une pulsation lumineale à l'intérieur de la structure tubulaire (Figure 42B).

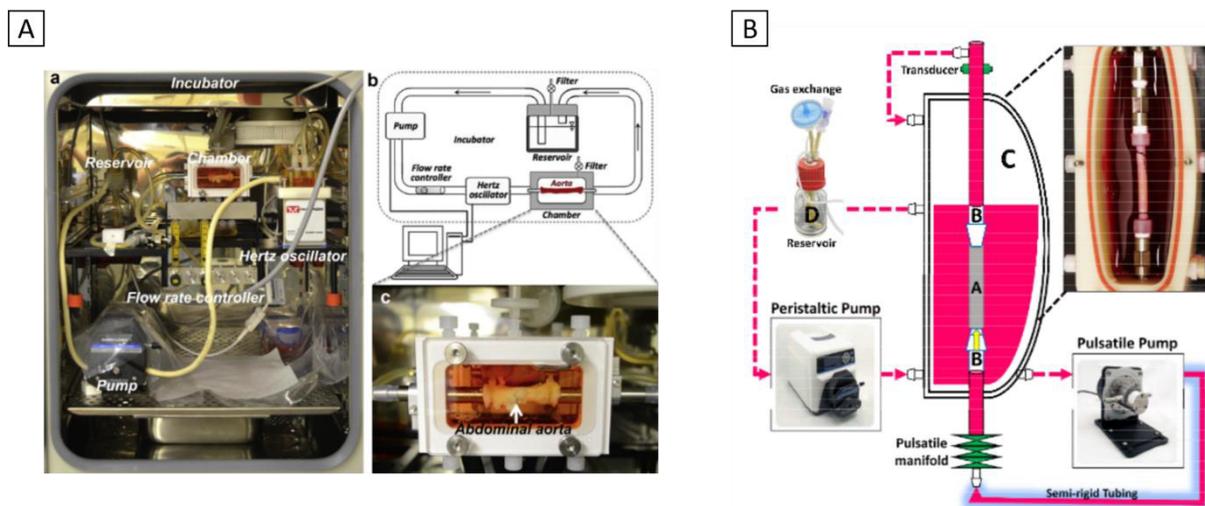


Figure 42 Exemples de bioréacteurs commerciaux. (A) Le bioréacteur LumeGen⁴²³ et (B) Le bioréacteur ElectroForce⁴²⁴.

Ces bioréacteurs commerciaux permettent d'avoir à disposition un système de culture *in vitro* reproduisant les conditions physiologiques du vaisseau sanguin. Cependant, ces bioréacteurs sont onéreux et pour la plupart, non modifiables. C'est pourquoi aujourd'hui un grand nombre de chercheurs s'orientent vers la conception de bioréacteurs « fait-maison ».

Dans leur travaux, Bono et al.⁴¹³ ont développé un bioréacteur bi-mode adapté à la fabrication de tissus de forme tubulaire directement dans la chambre de culture (mode construction) mais adapté aussi à la mise en place de la culture dynamique de ces structures tubulaires grâce à l'application de stimuli d'étirements circonférentiels contrôlés (mode culture). Ce système est composé d'une pompe péristaltique permettant de faire circuler le milieu de culture, une chambre de culture modulable pour accueillir des objets tubulaires de diamètre et de longueur différents un réservoir de milieu de culture et d'un système de contrôle/surveillance programmable pour exercer une stimulation pulsatile (l'étirement circonférentiel) sur l'objet (Figure 43A).

Betül Çelebi-Saltik et al.⁴¹⁸ ont aussi conçu leur propre bioréacteur perfusé. Leur système est composé d'une chambre connectée au réservoir du milieu de culture. Celui-ci est équipé de trois ports permettant une circulation de fluides et de l'air. Le milieu circule à l'intérieur de l'objet tubulaire grâce à une pompe péristaltique. Ce bioréacteur est placé dans un incubateur humidifié à 37°C, 5% CO₂ (Figure 43B)

Iris Plennings et al.⁴¹⁴ ont quant à eux, développé un autre système de bioréacteur perfusé. Un bioréacteur à deux compartiments a été conçu pour être capable d'appliquer des taux de cisaillement physiologiques dans la partie luminal de l'objet tubulaire, tout en permettant l'exposition des deux couches cellulaires de l'objet à leurs milieux nutritifs respectifs. L'apport d'un milieu de culture interne et d'un autre externe permet aux cellules des deux couches d'avoir leur propre environnement pour proliférer à l'intérieur de l'objet. Ce système de bioréacteur est composé d'une chambre de culture sur mesure pour l'objet tubulaire. La partie luminale du tube est connectée à une boucle d'écoulement permettant le passage d'un fluide de manière unidirectionnel alors que la partie externe du tube est exposée à des conditions de culture statiques. Une pompe à pression permet de réguler le débit du fluide à l'intérieur de la construction. Le système est placé dans un incubateur humidifié à 37°C, 5% CO₂ (Figure 43C).

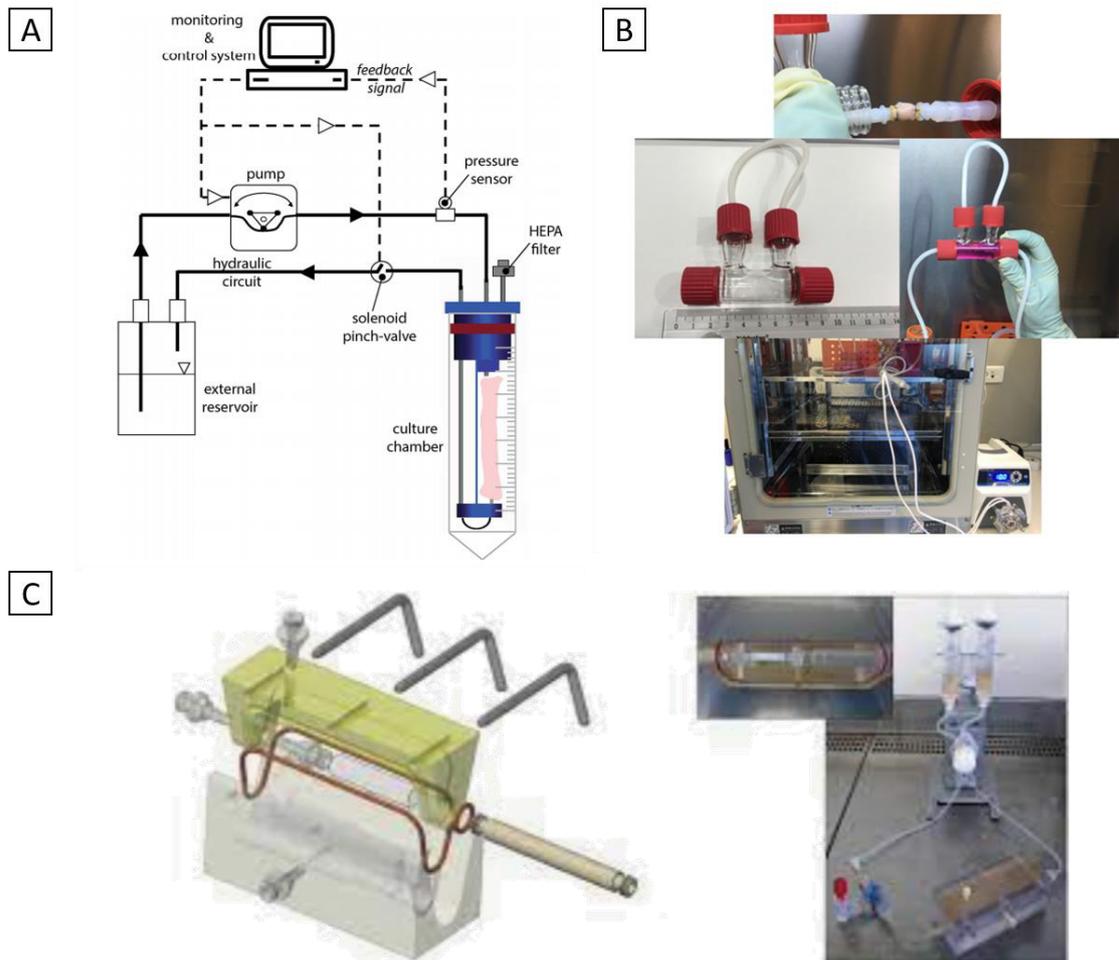


Figure 43 Exemples de conception de bioréacteurs "fait-maison". **(A)** Système de bioréacteur double-mode permettant à la fois de créer l'objet tubulaire et de permettre sa maturation à l'intérieur du même système⁴¹³; **(B)** Système de bioréacteur à perfusion permettant la diffusion d'un flux à l'intérieur de l'objet tubulaire⁴¹⁸; **(C)** Système de bioréacteur à perfusion pour une culture de tissu vasculaire à double couche avec la diffusion d'un flux à l'intérieur de l'objet tubulaire et une immersion de la couche externe de l'objet dans un milieu de culture différent⁴¹⁴.

VI.2.3. Les bioréacteurs : la stratégie de maturation

Dans le domaine du génie vasculaire, le choix du système de bioréacteur dépend des conditions de maturation attendues de la construction vasculaire. Différentes stratégies de maturation existent pour le développement des vaisseaux sanguins: avec un écoulement à travers le vaisseau⁴²⁵⁻⁴²⁷, avec une stimulation mécanique, avec un bioréacteur rotatif^{427,428}, ou avec une pression d'étirement^{427,429}.

Une des premières études de bioréacteurs pour greffes vasculaires a été réalisée en 1999 par Niklason et al.⁴³⁰ qui ont démontré la contribution vitale d'un flux interne induisant une contrainte de cisaillement de 3.10^{-2} Pa, pour la migration des cellules musculaires lisses à travers un échafaudage de structure vasculaire.

Jing Zhou et al.⁴³¹ ont également démontré l'importance d'un flux luminal sur le devenir des cellules endothéliales. Cela activerait un chemin de signalisation qui régulerait la prolifération, la maturation et la quiescence des SMC dans la couche suivante. La contrainte de cisaillement induite par l'écoulement au sein du bioréacteur de 1,2 Pa, ainsi que la communication entre les différentes cellules présentes dans le tissu vasculaire apparaissent alors comme une étape cruciale dans la formation d'un vaisseau fonctionnel.

Certains bioréacteurs effectuent également des simulations par impulsions pour imiter un battement cardiaque. Ces impulsions permettent de mettre en place des forces d'étirement sur la paroi vasculaire et ont un impact sur la maturation cellulaire. Dans leur étude, Chen Wang et al.⁴³² ont créé une construction vasculaire placée sous stimulation dynamique de 75 battements/min pendant 8 semaines. La construction vasculaire a montré une structure dense et bien organisée similaire à celle du vaisseau natif et présenté une amélioration significative des propriétés biomécaniques avec une résistance mécanique de 6.10^5 Pa pour la condition dynamique contre 2.10^5 pour la condition statique.

Aujourd'hui, les bioréacteurs pour l'ingénierie vasculaire ne sont en général utilisés que pour l'ensemencement de cellules endothéliales dans des échafaudages pour obtenir une endothélialisation complète et donc la formation uniquement de l'intima du vaisseau sanguin. A l'inverse, des techniques comme la bioimpression 3D permettraient aujourd'hui de recréer des tissus vasculaires formés à partir des différentes couches constituées de cellules endothéliales, de cellules musculaires lisses et de fibroblastes. Cependant, une fois recréée, la construction n'a pas de propriété mécanique suffisante pour résister à un écoulement et pour être manipulée aisément⁶. Pour acquérir ces capacités, les cellules de cette construction doivent proliférer et permettre en parallèle : une dégradation des biomatériaux qui constituent initialement la construction et une sécrétion de la matrice extracellulaire, aboutissant finalement à un tissu mature. Cette étape de maturation, vitale pour l'obtention

d'un vaisseau sanguin fonctionnel, est améliorée grâce à l'utilisation de bioréacteurs spécifiques.

Cependant, l'apparition d'un paradoxe dans le domaine de l'ingénierie vasculaire est constaté. Pour être fonctionnel, un vaisseau sanguin nouvellement recréé *via* une technique de biofabrication doit mûrir grâce à des facteurs extérieurs appliqués pour obtenir des propriétés physiologiques et une résistance mécanique suffisante. Or, pour permettre son intégration dans un bioréacteur, le vaisseau sanguin immature doit être suffisamment solide pour résister à un flux interne et être maintenu dans le bioréacteur *via* ses extrémités, tout au long du processus de maturation. En résumé, un vaisseau sanguin immature doit être placé dans un bioréacteur pour devenir fonctionnel, solide et manipulable, mais le vaisseau sanguin immature est trop fragile et non-manipulable pour être placé dans un bioréacteur. Les recherches futures en génie vasculaire devraient se concentrer davantage sur le domaine des bioréacteurs appliqués au développement de vaisseaux sanguins *in vitro* pour surmonter ces défis.

Les caractéristiques fondamentales pour la création et la réalisation d'un bioréacteur biomimétique pour des applications d'ingénierie vasculaire, sont résumées dans le Tableau 3.

Tableau 3 Caractéristiques fondamentales pour la création et la réalisation d'un bioréacteur biomimétique dédié à la culture de tissus vasculaires

Caractéristiques fondamentales	Description
Etanchéité	Permet de réduire les risques de contamination et la perte de milieu de culture
Dispositif transparent	Permet une surveillance constante tout au long de la maturation tissulaire
Facile à mettre en place / assembler	Moins de formation requise, mise en place expérimentale rapide
Capacité de surveillance du micro-environnement	Fournit des données sur les conditions de culture du tissu telles que le pH, la température, l'O ₂ , le CO ₂ , les métabolites
Utilisation de configurations et paramètres différents	Permet la culture de tissus de forme et de composition cellulaire variées
Insertion et récupération du tissu 3D rapide et facile	Permet une analyse post-culture efficace sans dommage du tissu
Haut débit	Acquisitions de données rapide
Pas de formation de bulles d'air	Les bulles d'air perturbent les cellules et le débit à travers les tuyaux

VII. Conclusions & Objectifs

La vascularisation est l'un des facteurs essentiels permettant la viabilité d'un tissu/organe grâce à l'apport d'oxygène et de nutriments jusqu'aux cellules ainsi que l'élimination des déchets métaboliques. Le réseau vasculaire étant formé de macro et de microvascularisations, les techniques de biofabrications à utiliser ne sont évidemment pas les mêmes.

La biofabrication de microvascularisations pour la création d'un tissu *in vitro* épais (> 1 cm²) est un objectif essentiel à ce jour. En effet, la majorité des tissus et organes étant vascularisés, le manque de celles-ci dans des modèles *in vitro* est problématique et engendre des limitations de greffes pouvant aller jusqu'à la nécrose du tissu. De nombreuses méthodes ont été développées permettant de recréer une microvascularisation, cependant ces méthodes sont généralement focalisées sur la représentation architecturale des microvaisseaux et non pas sur leurs fonctions biologiques complexes.

Depuis les recherches de Weinberg et Bell qui créèrent en 1986 le tout premier vaisseau sanguin d'ingénierie tissulaire à partir d'un échafaudage de collagène ensemencés de cellules endothéliales, de cellules musculaires lisses et de fibroblastes, le domaine de l'ingénierie de tissus vasculaires a fait d'énormes progrès. Cependant la difficulté de production de ces tissus en quantité suffisante en fonction de la demande clinique, reste à améliorer. A titre d'exemple, le greffon Lifeline™ est un objet tubulaire aux propriétés d'un vaisseau natif, formé grâce à l'utilisation de cellules de patients. C'est l'une des seules greffes sur le marché à ne posséder aucune matière synthétique ou exogène. Le point limitant de ce greffon est son temps de production de longue durée. Il serait compris entre 6 et 9 mois avec la partie principale de la production dédiée à la croissance et la maturation des fibroblastes jusqu'à ce que suffisamment de collagène soit sécrété pour conférer les propriétés mécaniques du greffon.

Dans la majeure partie des études, les objets vasculaires ne miment pas exactement la complexité de la paroi vasculaire et sont représentés uniquement par une seule couche de biomatériaux et une couche de cellules endothéliales dans la partie luminale. Or, comme nous avons pu le lire dans ce premier chapitre, le vaisseau sanguin natif est formé d'une paroi vasculaire complexe : l'*intima* représentée par les cellules endothéliales pour former un

endothélium, la *media* représentée par les cellules musculaires lisses et l'*adventice* représentée par les fibroblastes pour créer de la matrice. Les techniques de biofabrication telles que l'enroulage de feuillets cellulaires, le moulage de biomatériaux ou l'ensemencement d'échafaudages, ont montré leurs limitations : une hétérogénéité de la répartition cellulaire, un temps de production long, une mauvaise résistance mécanique, une durée de vie limitée, une reconstruction partielle de la paroi vasculaire. La biofabrication *in vitro* d'un tissu vasculaire à la structuration et aux fonctions biologiques pertinentes, reste un défi jusqu'à ce jour.

La bioimpression 3D par extrusion est alors apparue comme la solution prometteuse pour permettre de contourner les problèmes actuels. Elle permet notamment une grande flexibilité quant aux choix des biomatériaux associés aux cellules vasculaires, de la forme tridimensionnelle du tissu à créer ainsi qu'un développement tissulaire amélioré.

L'objectif de ce projet de thèse est de proposer des stratégies permettant de contourner certaines de ces limitations à travers le développement et l'optimisation d'une bioencore idéale et le choix de multiples techniques de biofabrications permettant le développement de tissus vasculaires (macrovascularisation) et de tissus vascularisés (microvascularisation). Ces études, principalement d'aspects techniques, seront suivies par une étude des communications cellulaires établies dans des systèmes de co-culture bioimprimés complexes permettant le développement d'un tissu conjonctif *in vitro* fonctionnel.

CHAPITRE II : MATÉRIEL & MÉTHODES

I. Culture 2D des cellules vasculaires

I.1. Les NIH 3T3 eGFP

Les NIH sont une lignée cellulaire de fibroblastes d'embryon de souris exprimant constitutivement la protéine fluorescente eGFP (AKR-214, Cell Biolabs). Le « 3T3 » fait référence à « *3-day transfer, inoculum 3x10⁵ cells* ». Elles sont cultivées dans du milieu de culture DMEM (31966047, Gibco), dépourvu d'antibiotiques et antifongiques et supplémenté avec 10 % (v/v) de sérum de veau fœtal (A3160802, Gibco). Elles sont amplifiées dans des flasques de culture de 25 cm² et sont passées tous les 3 jours lorsqu'une confluence de 95% est atteinte. Pour réaliser les passages cellulaires, une étape de rinçage au PBS (Phosphate Buffer Saline, 14190185, Gibco) est réalisée, puis de la trypsine/EDTA 0,05 % (15100054, Gibco) est utilisée pour décrocher les cellules de la flasque. Le DMEM complet inactive ensuite l'action de la trypsine et une étape de centrifugation à 300 g pendant 5 minutes (5810R, Eppendorf) est réalisée. Les NIH sont enfinensemencées dans de nouvelles flasques 25 cm² à une concentration de 3000 cellules/cm² et placées dans un incubateur à atmosphère humide, 37°C et 5 % CO₂ (ICO240, Memmert).

I.2. Les cellules endothéliales

Les HUVEC (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*, C-22011, PromoCell) sont des cellules primaires provenant d'un groupe de donneurs. Elles sont cultivées dans le milieu de culture EGM2 (*Endothelial cell Growth Medium 2*, C-22011, PromoCell), sans ajout d'antibiotiques, d'antifongiques ou de sérum de veau fœtal. Elles sont amplifiées dans des flasques de culture de 75 cm² avec un changement de milieu de culture tous les 3 jours et un passage tous les 7 jours, lorsqu'une confluence de 80% est observée. Lors de ces travaux de thèse, les HUVEC n'ont pas excédés plus de 4 passages. Pour réaliser les passages cellulaires, le *DetachKit 2* est utilisé (C-41220, PromoCell). Il comprend un rinçage par l'HBSS (*HEPES buffered Balanced Salt Solution*), puis le décrochement des cellules de la flasque grâce à la trypsine/EDTA 0,025%, une inactivation de cette trypsine par une solution de neutralisation de la trypsine et une centrifugation à 220 g pendant 3 minutes (5810R, Eppendorf). Les HUVEC sontensemencées

dans de nouvelles flasques 75 cm² à une concentration de 6000 cellules/cm² et placées dans un incubateur à atmosphère humide, 37°C et 5% CO₂ (ICO240, Memmert).

I.3. Les fibroblastes

Les fibroblastes proviennent d'échantillons de peau humaine normale issue de donneurs anonymes du Laboratoire de substituts cutanés de Lyon (Hôpital Edouard Herriot). Les résidus chirurgicaux sont prélevés conformément à la réglementation française en vigueur (DC n°2014-2281) et avec l'accord du consentement écrit du patient. Les échantillons sont par la suite dissociés et purifiés pour obtenir les fibroblastes dermiques. Ces cellules sont cultivées dans du milieu de culture DMEM (31966047, Gibco), sans ajout d'antibiotiques et antifongiques et supplémenté avec 10 % (v/v) de sérum de veau fœtal (A3160802, Gibco). Elles sont amplifiées dans des flasques de culture de 75 cm² avec un changement de milieu de culture tous les 3 jours et un passage tous les 7 jours lorsqu'une confluence de 90% est atteinte. Durant les travaux de cette thèse, les fibroblastes n'ont pas excédé 5 passages. Pour réaliser les passages cellulaires, une étape de rinçage par du PBS (Phosphate Buffer Saline, 14190185, Gibco) est réalisée, puis de la trypsine/EDTA 0,05% (15100054, Gibco) est utilisée pour décrocher les cellules de la flasque, le DMEM complet inactive ensuite l'action de la trypsine et une étape de centrifugation à 300 g pendant 5 minutes (5810R, Eppendorf) est réalisée. Les fibroblastes sontensemencés dans de nouvelles flasques 75 cm² à une concentration de 5500 cellules/cm² et placées dans un incubateur à atmosphère humide, 37°C et 5% CO₂ (ICO240, Memmert).

I.4. Les cellules musculaires lisses vasculaires

Les hAoSMCs (*human Aortic Smooth Muscle Cells*, CC-3182, Lonza) sont des cellules humaines primaires provenant d'un unique donneur. Elles sont cultivées dans le milieu de culture SmGM2 (*Smooth Muscle Cell Growth Medium 2*, CC-3182, Lonza) sans ajout supplémentaire d'antibiotiques, antifongiques ou sérum de veau fœtal. Elles sont amplifiées dans des flasques de culture de 75 cm² avec un changement de milieu tous les 2 jours et un passage cellulaire lorsqu'une confluence de 80% est observée. Pour réaliser les passages cellulaires, le *ReagentPack™* est utilisé (CC-5034, Lonza). Il comprend une solution de rinçage des cellules HBSS, de la trypsine/EDTA 0,025% pour le décrochage des cellules de la flasque de culture et

une solution de neutralisation de la trypsine. Les cellules sont ensuite centrifugées à 220 g pendant 5 minutes (5810R, Eppendorf). Les hAoSMCs possèdent un phénotype contractile, non prolifératif. De ce fait elles sont très compliquées à cultiver et à amplifier en 2D. La durée de doublement de la culture varie extrêmement vite au fur et à mesure des passages. Pour conserver le phénotype contractile durant ces travaux de thèse, les hAoSMCs n'ont subi qu'un seul passage avant leur utilisation pour la bioimpression.

II. Biofabrication du tissu vasculaire

Toutes les étapes qui vont suivre sont parfaitement optimisées et adaptées pour une survie cellulaire maximale. De la préparation de la bioencres, à l'étape de biofabrication par bioimpression 3D, jusqu'à l'étape de consolidation, les temps de réalisation sont optimisés pour être les plus rapides possibles, permettant ainsi de réduire au maximum le stress subi par les cellules⁴³³ et leur fournir une parfaite maturation en un tissu biologiquement pertinent.

II.1. Hydrogel support en microparticules de gélatine

Un hydrogel support en microparticules de gélatine pour la bioimpression 3D de tissu vasculaire tubulaire a été fabriqué pour l'utilisation de techniques de biofabrications particulières.

Pour cela, deux jours avant l'étape de bioimpression, de la gélatine (G1890, Sigma-Aldrich) à une concentration de 2 % (m/v), du Pluronic F-127 (P2443, Sigma-Aldrich) à une concentration de 0,25 % (m/v) et de la gomme arabique (G9752, Sigma-Aldrich) à une concentration de 0,1 % (m/v) sont mélangées dans un bécher de 1L. Ils sont ensuite dissout dans 50 % (v/v) d'éthanol/H₂O à 45°C. Le pH est ajusté à 6,25 à l'aide d'une solution d'acide chlorhydrique à 1 M. Le bécher est placé sous agitation à 400 rpm l'aide d'une pale rotative toute la nuit à température ambiante. Un parafilm est placé sur le bécher afin d'éviter toute évaporation.

Le lendemain, J-1 avant bioimpression, les microparticules de gélatine formées dans le bécher sont transférées dans des tubes à centrifuger de 50 mL (Falcon) et centrifugés 5 minutes à 300 g. Le surnageant est retiré et les microparticules sont suspendues dans une solution de CaCl₂ de concentration de 165 mM. Les tubes sont ensuite centrifugés 2 minutes à 1000g. Le surnageant est éliminé et les microparticules resuspendues dans la solution de CaCl₂ de

concentration de 165 mM. Cette étape est répétée trois fois pour un rinçage optimal des microparticules. Lors du dernier compactage de ces microparticules, une centrifugation de 5 minutes à 2000 g est réalisée. Le surnageant est éliminé. Les microparticules contenues dans les différents tubes sont transvasées dans un cristalliseur couvert de parafilm et incubé une nuit à 4°C.

Le jour de la bioimpression, le gel est sorti quelques minutes avant son utilisation pour se stabiliser à température ambiante (21°C).

II.2. Préparation de la bioencres

La bioencres développée lors de ces travaux de recherche est composée de trois biomatériaux distincts : la gélatine, l'alginate et le fibrinogène à des concentrations précises. La bioencres est préparée le jour même de la bioimpression du tissu et toutes les étapes sont réalisées dans un laboratoire P2 décontaminé à l'ozone et thermostaté à 21°C et sous un poste de sécurité microbiologique (PSM).

II.2.1. Préparation des solutions mères

Les milieux de culture utilisés pour la préparation de la bioencres ne sont pas chauffés et sont utilisés directement à froid après leur sortie du frigo, à 4°C.

Les solutions de biomatériaux sont préparées dans des tubes stériles à fond conique de 50 mL (Falcon). Pour cela, sous un PSM, la gélatine d'origine porcine de type A (G1890, Sigma-Aldrich) est préparée à une concentration de 150 mg/mL dans du DMEM et placée dans un incubateur à humidité contrôlée, 37°C et 5% CO₂. L'alginate de sodium (180947, Sigma-Aldrich) est préparée à une concentration de 20 mg/mL dans du DMEM et placé sous agitation à 21°C jusqu'à solubilisation. Le fibrinogène provenant de plasma bovin (F8630, Sigma-Aldrich) est préparé à une concentration de 80 mg/mL dans du DMEM sans calcium et placé dans un incubateur à humidité contrôlée, 37°C et 5% CO₂.

II.2.2. Préparation des cellules vasculaires

Une fois les solutions mères de gélatine, d'alginate et de fibrinogène solubilisées, elles sont stockées toutes les trois dans l'incubateur à 37°C jusqu'à leur utilisation. Pour réaliser la

bioencres, une quantité de cellules prédéterminée doit être mélangée aux solutions de biomatériaux précédemment préparées. Les fibroblastes, les HUVEC et les CMLVs sont trypsinés suivant leurs protocoles respectifs. Durant cette étape, toutes les cellules à utiliser pour composer la bioencres, doivent être trypsinées en même temps pour conserver les différentes cellules dans les mêmes conditions tout au long de l'expérimentation. Les cellules sont comptées avant l'étape de centrifugation puis centrifugées pour former les différents culots cellulaires. A ce moment là, différents protocoles ont été établis suivant la nature de l'expérience à réaliser.

i. Méthode directe

Cette méthode repose sur le fait de recréer un tissu vasculaire directement avec sa forme tubulaire et plus particulièrement sur le fait de recréer directement les trois couches de la paroi vasculaire. Lors de cette méthode, nous allons spatialement organiser les cellules dans l'objet 3D durant l'étape de bioimpression 3D.

Les différents types cellulaires doivent donc être ensemencés dans trois bioencres distinctes, de composition et de concentration finale en biomatériaux identiques (Figure 44) :

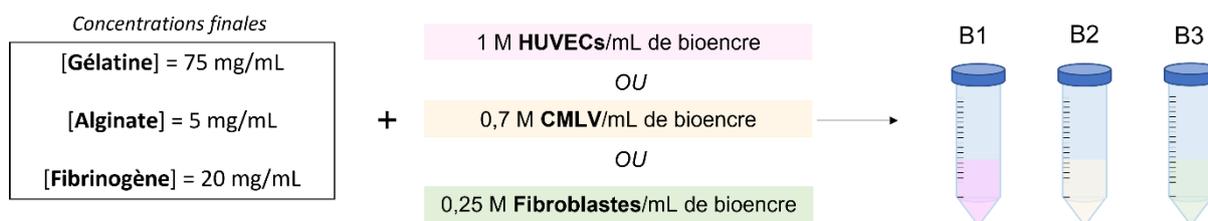


Figure 44 Représentation schématique de l'étape de préparation de la bioencres en utilisant un seul type cellulaire pour chaque bioencres.

Trois bioencres différentes B1, B2 et B3, sont ainsi fabriquées et composées respectivement de 1 million d'HUVEC, 0,7 million de CMLV et 0,25 million de fibroblastes par millilitre de bioencres. Chacune de ces bioencres peut être utilisée indépendamment des autres.

ii. Méthode indirecte

Cette méthode réside dans l'auto-organisation spatiale des cellules à l'intérieur de l'objet 3D après l'étape de bioimpression. Les différents types cellulaires vont donc être mélangés dans une seule et unique bioencres, de composition et de concentration en biomatériaux identique à celle de la méthode directe. La concentration de cellules par millilitre de bioencres doit être adaptée en fonction du type cellulaire à ajouter aux solutions mères de biomatériaux.

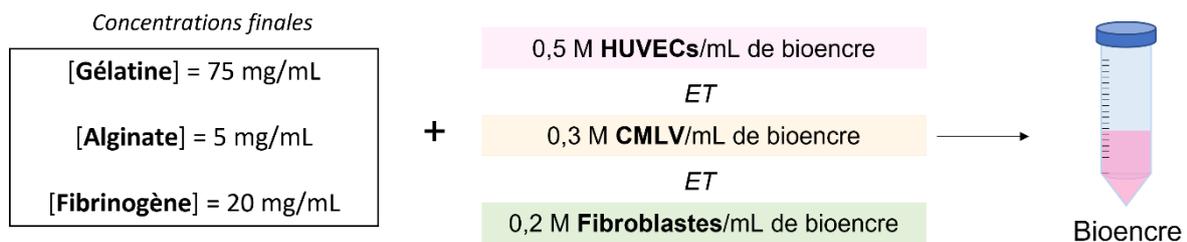


Figure 45 Représentation schématique de l'étape de préparation de la bioencres en utilisant les trois types cellulaires dans la même bioencres.

Une seule bioencres est ainsi fabriquée et composée cette fois-ci des trois différents types cellulaires.

II.3. Bioimpression 3D

II.3.1. Préparation de la seringue d'impression

Une fois les solutions mères de biomatériaux et les cellules d'intérêt prêtes, elles vont être mélangées en respectant un protocole bien précis, pour former une bioencres. Lors du passage des cellules, après leur centrifugation, le surnageant est éliminé pour ne garder que le culot cellulaire. Celui-ci est légèrement tapoter agité pour permettre sa re-solubilisation.

A ce moment là, les solutions de biomatériaux sont sorties de l'incubateur et placées sous le PSM. Pour préparer un volume de 8 mL de bioencres, à l'aide d'une pipette à liquide visqueux, 2 mL de fibrinogène sont ajoutés directement sur le culot cellulaire resuspendu. Ensuite, 2 mL d'alginate puis 4 mL de gélatine sont ajoutés. Aucun mélange n'est effectué avec la pipette à

liquide visqueux mais seulement par retournement des tubes, pour minimiser le stress cellulaire.

La bioencres liquide est placée dans l'incubateur à atmosphère humide 37°C, 5% CO₂ pendant 10 minutes. Ensuite, la bioencres liquide va être transférée dans une seringue d'impression de volume 10 mL (Nordson EFD). Pour cela elle est sortie de l'incubateur, un mélange délicat est effectué *via* une rotation légère du tube pour prévenir la sédimentation cellulaire. La bioencres liquide est ensuite transférée dans une seringue d'impression stérile, de façon manuelle, en la faisant couler sur les parois pour éviter toute formation de bulle. Un piston stérile est inséré dans la seringue puis celle-ci est retournée pour permettre une brève évacuation d'air grâce à une pression sur le piston.

La seringue d'impression contenant la bioencres liquide est placée pendant 30 minutes dans le noir dans une enceinte thermostatée à 21°C. Cela lui permet d'atteindre une viscosité stable et adaptée à la création d'un objet 3D.

II.3.2. Imprimante 3D : TOBECA®

Durant ces travaux de recherche, une imprimante 3D commercialisée par TOBECA® a été utilisée. C'est une imprimante *open-source*, totalement personnalisée pour la bioimpression 3D. Initialement adaptée pour la technologie d'impression 3D FDM (Fused Deposition Modeling), c'est-à-dire l'impression de filaments thermoplastiques, elle a été transformée pour être utilisée pour la bioimpression 3D. L'extrudeur plastique a donc été substitué par un système permettant simplement de fixer une seringue d'impression. La pression appliquée sur la seringue et permettant d'extruder la bioencres, est contrôlée grâce à un système pneumatique adapté (Nucleus, TOBECA®). Enfin, la taille de l'imprimante lui permet d'être placée sous un PSM, afin d'être en zone totalement stérile durant toutes les étapes de bioimpression.

II.3.3. Logiciel d'impression 3D : Repetier-Host

L'imprimante 3D est pilotée grâce à un logiciel *open-source*, Repetier-Host. Celui-ci permet de réaliser 4 étapes majeures :

- i. Une fois l'objet 3D modélisé à l'aide d'un logiciel de conception assistée par ordinateur (CAO) tel que SketchUp® ou 3DBuilder, le modèle 3D est converti en un fichier STL (*Standard Tessellation Language*) et importé dans le logiciel Repetier-Host pour être positionné sur le plateau d'impression virtuel. Il peut être redimensionné, dupliqué, pivoté, si nécessaire (Figure 46).

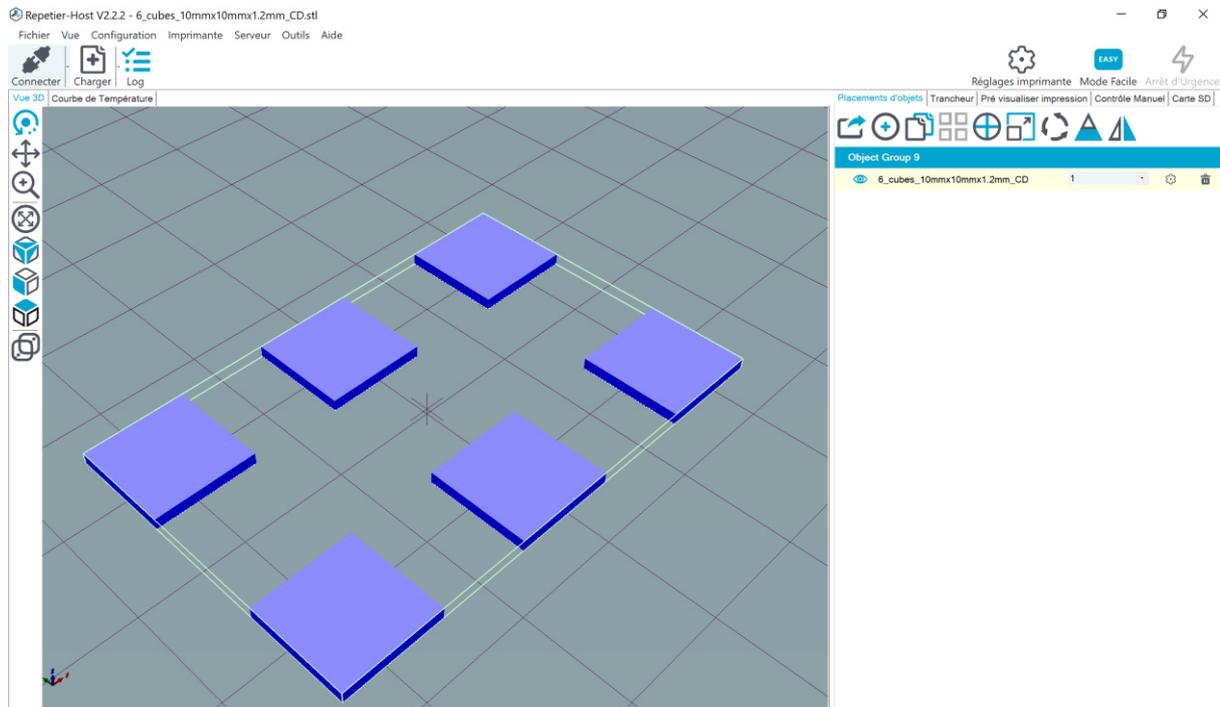


Figure 46 Logiciel Repetier-Host avec 6 objets 3D positionnés sur le plateau virtuel d'impression avant bioimpression.

- ii. Une fois l'objet positionné correctement sur le plateau virtuel d'impression, les paramètres d'impression optimaux doivent être déterminés grâce à un sous logiciel de tranchage associé à Repetier-Host : Slic3r. Le choix de la vitesse d'impression, du nombre de couches, du remplissage (déterminant la porosité de l'objet), du diamètre de l'aiguille d'impression, sont ainsi déterminés durant cette étape (Figure 47).

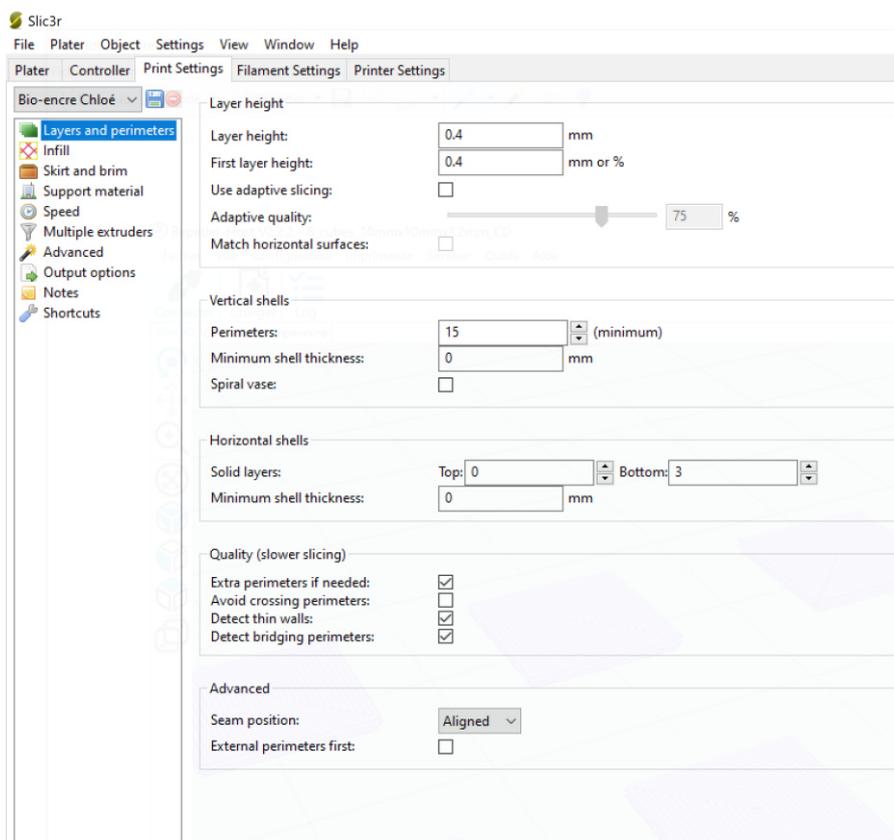


Figure 47 Onglet d’affichage de Slic3r permettant de modifier les paramètres à déterminer avant la bioimpression.

Les paramètres d’impression que nous avons utilisés durant ces travaux de thèse sont résumés dans le **Tableau 4** suivant :

Tableau 4 Paramètres optimaux utilisés pour la bioimpression de tissus vasculaires avec la bioencres formulée durant ces travaux de thèse.

Paramètres de tranchage	Valeurs appliquées
Hauteur de couche	400 μ m
Vitesse d’impression	10 mm/sec
Remplissage	100 %
Motif de remplissage	Concentrique
Diamètre de l’aiguille	400 μ m

- iii. Grâce à la mise en place de ces paramètres, pour 6 objets de taille identique (10 mm x 10 mm x 1,2 mm) le tranchage indique alors un temps total d'impression d'environ 6 min, pour 3 couches de 400 μ m chacune. Le motif concentrique est bien respecté comme nous pouvons le voir sur la Figure 48.

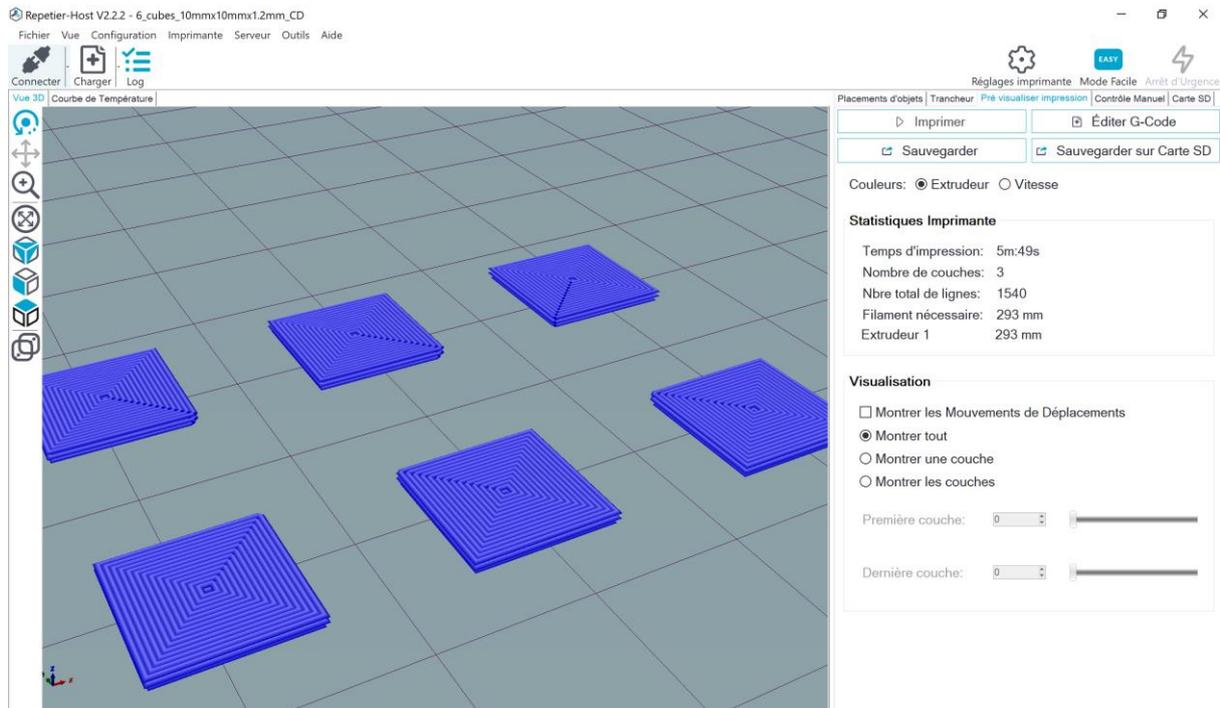


Figure 48 Logiciel Repetier-Host représentant 6 objets 3D après application des paramètres de tranchage.

- iv. La dernière étape est le lancement de l'impression. La seringue contenant la bioencres est positionnée suivant les coordonnées x, y et z de notre choix sur le plateau d'impression. Le système de pression pneumatique est branché à la seringue et la pression optimale est appliquée sur l'appareil. Une fois que tous ces paramètres sont fixés, l'impression est lancée.

II.3.4. Consolidation de l'objet 3D

Une fois les objets 3D bioimprimés, une étape de consolidation est réalisée pour leur maintien à température physiologique (37°C) ainsi que pour la survie des cellules vasculaires. Cette

solution est composée de chlorure de calcium et de thrombine, permettant la chélation de l'alginate et l'autoassemblage du fibrinogène en réseau de fibrine insoluble.

Une solution unique de polymérisation a été développée durant mes travaux de recherche et sera développée en détail dans le chapitre IV. Pour son élaboration, des solutions de CaCl_2 de concentrations allant de 1,45 mM à 165 mM (C-5670-500G, Sigma Aldrich) ainsi qu'une solution de thrombine de 10 U/mL (T4648-10KU, Sigma-Aldrich) ont été utilisées.

Pour réaliser cette solution, le CaCl_2 est pesé dans un tube à fond conique de 50 mL (Falcon[®]). La poudre est dissoute dans du milieu de culture DMEM sans calcium (21068028, Gibco). La solution est ensuite filtrée à travers un filtre de 0,22 μm . La thrombine n'étant pas stable sous forme sa forme solubilisée, elle est décongelée quelques secondes avant son ajout dans la solution de CaCl_2 préalablement préparée.

La solution de polymérisation ainsi préparée est versée sur les objets 3D. À l'aide d'une spatule stérile, les objets sont décollés du support dans lequel ils ont été imprimés pour que la solution de consolidation agisse de manière homogène. Les objets 3D sont placés 5 minutes à 21°C puis sont incubés en conditions physiologiques à 37°C. Enfin, la solution de consolidation est éliminée et remplacée par du milieu de culture frais.

Toutes les solutions et les milieux de cultures utilisés durant l'étape de polymérisation sont utilisées à froid, à 4°C.

II.4. Suivi post-impression : maturation tissulaire

Le protocole de maturation des objets a évolué durant ces travaux de recherche et dépend des cellules contenues dans l'objet.

Globalement, un changement de milieu est effectué directement après l'étape de polymérisation. Les objets sont alors placés dans des plaques 12 puits non traitées pour la culture cellulaire et 2 mL de milieu de culture frais sont ajoutés par puit. Les objets sont alors placés à 37°C pendant toute la durée de la maturation jusqu'à formation d'un tissu vasculaire.

Un changement de milieu total est effectué au bout de 7 jours post-impression durant la phase d'adhésion et de prolifération cellulaire. Puis des changements de milieux partiels sont

effectués à divers intervalles de temps en fonction de la taille de l'objet, de la densité cellulaire et suivant la consommation des nutriments par les cellules, identifiée grâce aux changements de couleur des milieux de cultures.

III. Méthodes de caractérisation

III.1. Imprimabilité de la bioencres : rhéologie

Une étape de caractérisation de la bioencres permet de s'assurer de l'imprimabilité de la bioencres à une température donnée et permet également d'avoir des informations quant à ses capacités de déformation, de gélification, de résistance face à une contrainte. Pour cela, nous utilisons un rhéomètre rotationnel à contrainte imposée (DHR2, Instrument TA) associée à une géométrie cylindrique. Le rhéomètre est piloté *via* le logiciel, Trios.

Environ 15 mL de bioencres doit être préparée pour convenir à la géométrie cylindrique du rhéomètre. La bioencres, une fois prête à analyser, est incubée pendant 10 minutes à 37°C et versée ensuite dans le cylindre du rhéomètre. La géométrie cylindrique est ensuite plongée dans la bioencres et une étape d'incubation de 15 minutes à la température de mesure, est réalisée pour permettre à la bioencres de se stabiliser. Deux essais sont alors réalisés et indiqués dans le logiciel Trios :

- i. Un essai de balayage en fréquence, ou mode dynamique, pour caractériser le comportement viscoélastique de la bioencres.
- ii. Un essai de rampe en contrainte, ou mode continu, pour mesurer la contrainte seuil de la bioencres.

Les données sont ensuite récupérées sur le logiciel Trios et traitées sur Excel.

III.2. Adhésion et prolifération des cellules : calcéine AM

Dans le cas des tissus contenant des cellules fluorescentes, le suivi de croissance en temps réel à l'intérieur de l'objet s'effectue directement par microscopie optique à travers un filtre adapté, sans étape de préparation préalable. Dans le cas où les tissus ne contiennent pas de cellules fluorescentes, une étape de marquage est nécessaire pour visualiser les cellules en

microscopie optique. Le marqueur calcéine AM a ainsi été utilisé. Cette observation microscopique est une étape de caractérisation préliminaire permettant de s'assurer de la croissance cellulaire à l'intérieur de l'objet et d'établir un premier suivi de maturation.

La calcéine AM (C1430, ThermoFisher scientific) est un colorant perméant utilisé pour déterminer la viabilité cellulaire de la plupart des cellules eucaryotes. La calcéine AM non fluorescente entre dans les cellules vivantes et est convertie en calcéine à fluorescence verte, après hydrolyse de son ester acétoxyméthyle par des estérases intracellulaires. Elle est excitée à une longueur d'onde de 494 nm et émet à une longueur d'onde de 517 nm.

Toutes les étapes suivantes doivent être réalisées rapidement et à l'abri de la lumière. L'objet doit être préalablement rincé par du PBS pour éviter toute auto-fluorescence liée à la présence de milieu de culture. Puis, pour un objet de taille standard 10 mm x 10 mm x 1,2 mm dans un puits de plaque 12 puits, 2 mL de calcéine AM à une concentration de 2 μ M sont utilisés. L'objet immergé dans la calcéine AM est incubé à 37°C pendant 30 minutes puis les cellules sont observées directement au microscope optique dans une pièce noire (Eclipse Ts2R, Nikon).

Il est important de noter que durant toute la maturation tissulaire, les colorations par la calcéine AM sont toujours effectuées sur des échantillons différents pour ne pas accumuler l'effet potentiellement négatif de la calcéine AM sur la croissance cellulaire.

III.3. Histologie

Lorsque les objets bioimprimés sont matures, plusieurs méthodes d'analyses sont possibles. Pour cela, des marquages spécifiques doivent être réalisés. L'histologie permet d'étudier les tissus biologiques et plus particulièrement la structure des organismes vivants, leurs interactions avec leur micro-environnement ainsi que la structure de la matrice tissulaire. Pour observer la maturation des tissus bioimprimés, une étape de fixation est nécessaire pour conserver les structures intactes et rendre les tissus manipulables.

III.3.1. Préparation du tissu

Cette étape est réalisée directement à la fin de la culture par immersion totale du tissu dans un liquide fixateur. Pour cela, une solution de paraformaldéhyde (PFA) prête à l'emploi (2545827, M-M France) à une concentration de 4 % (v/v), est utilisée pour fixer les tissus bioimprimés. Sous une hotte chimique, le milieu de culture des tissus est éliminé et la solution de PFA ajoutée. Les tissus sont ensuite incubés à 4°C au maximum 24h (la durée de fixation est dépendante de la taille et de la densité du tissu). Après élimination du PFA, les tissus sont rincés deux fois dans une solution de PBS pour diminuer l'excédent de PFA. Ils sont ensuite transférés dans des cassettes histologiques immergées dans de l'éthanol/H₂O à une concentration de 70 % (v/v). Les échantillons sont stockés au frigo à 4°C jusqu'à leur inclusion en paraffine.

Les prochaines étapes sont réalisées par la plateforme PrImaTiss (préparation et imagerie des tissus) au Laboratoire de Biologie Tissulaire et Ingénierie thérapeutique (LBTI) à Lyon. L'inclusion va permettre de réaliser des coupes fines et régulières de nos tissus. Elle est réalisée dans un milieu d'inclusion, la paraffine. Pour ce faire, tissu doit subir des étapes de déshydratation par immersion dans des bains d'éthanol de pourcentages croissants puis dans des bains de toluène grâce à un automate HISTO 5 de Millestone. Le tissu est ensuite inclus dans un moule de paraffine chaude grâce à une station d'enrobage MICROM EC 350. Après refroidissement, un bloc de paraffine dur est obtenu et contient le tissu intact.

Des coupes ultrafines sont ensuite réalisées à l'aide d'un microtome rotatif automatique HM 355S et sont récoltées sur des lames de verre. Ces coupes sont ensuite colorées ou marquées.

III.3.2. Colorations et marquages

i. Les colorations

Les colorations qui sont effectuées en routine sur les lames permettent d'accentuer le contraste pour faciliter la reconnaissance des divers éléments présents dans le tissu. Les colorants étant préparés dans des solutions aqueuses, les lames subissent au préalable une étape de réhydratation. La coupe doit alors être déparaffinée grâce à la chaleur et à des bains de toluène puis elle est immergée dans des bains d'éthanol de pourcentage décroissant et enfin dans un bain d'eau distillée. La lame peut ensuite être colorée.

Les colorations de routine utilisées sont les suivantes (**Tableau 5**) :

Tableau 5 Descriptif des deux colorations de routine utilisées lors de la caractérisation des tissus vasculaires.

Nom	Cibles	Coloration observée
Hématoxyline Eosine (HE)	Noyaux	Bleu / Violet
	Cytoplasme	Rose
Trichrome de Masson (TM)	Noyaux	Violet foncé
	Cytoplasme	Rose foncé / rouge
	Fibre de collagène	Vert

La coloration à l'hématoxyline Eosine (HE) est une coloration bichromatique utilisant un colorant nucléaire, l'hématoxyline et un colorant cytoplasmique, l'éosine. La coloration Trichrome de Masson est une coloration trichromatique utilisant un colorant nucléaire, l'hématoxyline, un colorant cytoplasmique, le Fuchsine-ponceau et un colorant pour les fibres de collagène, le vert lumière.

ii. Les marquages

L'immunohistochimie (IHC) est une méthode permettant de localiser les protéines présentes dans une coupe de tissu grâce à la détection d'antigènes par des anticorps spécifiques. Ces anticorps peuvent être d'origine monoclonaux ou polyclonaux, les anticorps monoclonaux étant plus spécifiques. Une liaison anticorps/antigène peut être visualisée selon deux méthodes spécifiques dites « indirectes » du fait de l'utilisation d'un anticorps primaire puis d'un anticorps secondaire marqué et dirigé contre une partie de la structure de l'anticorps primaire. La 1^{ère} méthode « indirecte » correspond à la conjugaison de l'anticorps secondaire avec une enzyme, la peroxydase, qui catalyse une réaction de production de couleur (souvent marron foncée). La 2^{nde} méthode « indirecte » est l'immunofluorescence (IF) et correspond au

marquage de l'anticorps secondaire par un fluorochrome qui va émettre une lumière fluorescente lorsqu'il sera excité par une longueur d'onde spécifique.

De son côté, la méthode d'IHC directe permet une coloration en une seule étape grâce à l'utilisation d'un anticorps déjà conjugué à un marqueur de la substance cible. Cependant cette méthode possède une faible sensibilité et est de ce fait rarement utilisée.

Les différents anticorps utilisés lors de ces travaux sont résumés dans le Tableau 6 :

Tableau 6 Descriptifs des différents marqueurs utilisés pour la caractérisation du tissu vasculaire.

Antigène cible	Structure marquée	Source de l'anticorps	Fournisseur - Référence	Fluorochrome associé
CD31	CD31/PECAM-1	Polyclonal Espèce : chèvre	R&D Systems – AF3628	NL493
EN4	Endothélium	Monoclonal Espèce : souris	Abcam – ab8087	Alexa Fluor® 568
α-SMA	Filaments d'actine	Monoclonal Espèce : souris	Merck – A2547	Alexa Fluor® 568
NG2	Péricyte	Recombinant Espèce : lapin	Abcam – ab183929	Alexa Fluor® 488
Collagène-1	Collagène de type I humain	Polyclonal Espèce : lapin	Novotec – 20111	-

En immunofluorescence, un contre-marquage est réalisé pour chacune des lames permettant de visualiser la présence des cellules vivantes dans le tissu. Pour cela, le DAPI, ou 4',6-diamidino-2-phénylindole, est utilisé (D3571, Invitrogen). C'est une molécule fluorescente

bleue capable de se lier fortement aux bases adénine (A) et thymine (T) de l'ADN. Elle est excitée à une longueur d'onde de 358 nm et émet à une longueur d'onde de 461 nm.

Une fois que les différentes colorations ou marquages sont réalisés sur les tissus, les coupes sont montées entre lame et lamelle et sont prêtes à être observées en microscopie.

III.4. Observations microscopiques

III.4.1. Microscopie confocale

Les lames marquées grâce à un fluorochrome ont pu être observées par microscopie confocale sur la plateforme du Centre d'Imagerie Quantitative Lyon-Est (CIQLE). Le microscope confocal spectral sur statif inversé (LSM 880 NLO, ZEISS) a été utilisé lors de ces travaux. Il possède une chambre d'incubation avec un contrôle environnemental de la température, du CO₂ et de l'hygrométrie.

III.4.2. Microscopie Electronique à Transmission (MET)

L'ultrastructure des tissus vasculaires bioimprimés a été étudiée grâce à des analyses par microscopie électronique à transmission (MET) réalisées au Centre d'Imagerie Quantitative Lyon-Est (CIQLE). Pour cela, les tissus ont été coupés en morceaux d'environ 1 mm de côté puis fixés dans du glutaraldéhyde à une concentration de 2 % (v/v) pendant 2h à 4°C. Les tissus ont été lavés trois fois pendant 1h à 4°C et post-fixés avec une solution aqueuse de tétroxyde d'osmium à une concentration de 2 % (v/v) pendant 1h à 4°C. Les tissus ont été déshydratés dans des bains de concentrations croissantes d'éthanol/H₂O puis rincés dans de l'oxyde de propylène. L'imprégnation a été réalisée avec Epon A (75% v/v), Epon B (25% v/v) et DMP30 (1,7% v/v). L'inclusion a été obtenue par polymérisation à 60°C pendant 72h. Des sections ultrafines (environ 70 nm d'épaisseur) ont été réalisées sur un ultramicrotome (UC7, Leica). et montées sur des grilles de cuivre de 200 mesh recouvertes de polylysine, stabilisées pendant 1 jour à température ambiante et contrastées avec de l'acétate d'uranyle et du citrate de plomb. Les coupes ont été analysées à l'aide d'un microscope électronique à transmission Jeol 1400JEM, 80 kv, équipé d'une caméra Orius 600 et d'un micrographe numérique.

III.5. ELISA : méthode par chimiluminescence

Les facteurs sécrétés par les cellules dans les tissus bioimprimés ont été analysés par une méthode semi-quantitative de détection par chimiluminescence.

Pour cela, le surnageant de culture a été récolté 72h après bioimpression, pendant la phase de croissance des cellules en 3D pour permettre de récolter les concentrations les plus élevées de facteurs. Les surnageants sont ensuite stockés à -80°C jusqu'à leur utilisation.

Les facteurs sécrétés par les cellules dans les tissus ont été analysés par chimiluminescence grâce à un kit ELISA multiplexe d'angiogenèse humaine (AAH-ANG-1000-2, Raybiotech). Cette matrice permet de détecter 43 facteurs angiogéniques humains dans du sérum, du plasma, du milieu de culture ou encore du surnageant de culture.

Les surnageants de culture ainsi que tous les réactifs sont décongelés à température ambiante juste avant l'expérimentation. Les surnageants sont centrifugés pendant 5 minutes à 10 000 rpm. Le cocktail d'anticorps biotinylés (ITEM3) et la HRP-Streptavidine concentrée (ITEM4) sont centrifugés à 1000 g pendant 1 minute.

Chaque membrane possédant la matrice d'anticorps est placée, à l'aide de pinces stériles, dans un puit du plateau d'incubation. 2 mL de tampon de blocage sont ensuite ajoutés dans chaque puit et incubés pendant 30 minutes à température ambiante. Le tampon de blocage est ensuite éliminé. 1 mL d'échantillon est ajouté dans chaque puit et incubé pendant 1,5 à 5 h à température ambiante. 2 mL de tampon de rinçage I 1X sont ensuite ajoutés dans chaque puit et incubés 5 minutes à température ambiante. Cette opération est répétée deux fois avec du tampon de rinçage frais et une élimination complète du précédent tampon de rinçage est effectuée. 2 mL de tampon de rinçage II 1X sont ajoutés dans chaque puit et incubés pendant 5 minutes à température ambiante. Cette opération est répétée 1 fois de plus. 1 mL de cocktail d'anticorps biotinylés est ensuite ajouté dans chaque puit et incubé pendant 1,5 à 2 h à température ambiante. Le cocktail d'anticorps est éliminé puis les membranes sont rincées aux tampons de rinçage I et II 1X comme précédemment. 2 mL de HRP-Streptavidine 1X sont ajoutés dans chaque puit et incubés pendant 2h à température ambiante. La solution de HRP-

Streptavidine est ensuite éliminée et les membranes sont de nouveau rincées comme précédemment avec les tampons de rinçage.

Les membranes sont ensuite transférées sur un papier buvard ou papier à chromatographie. L'excès de tampon est retiré en tapotant les bords à l'aide d'un autre papier. Les membranes sont ensuite placées sur une feuille plastique. Les tampons de détection C et D sont ajoutés dans un tube stérile (1 :1) puis homogénéisés. 50 µL de mélange des tampons de détection C et D sont ajoutés sur chaque membrane puis incubés pendant 2 minutes à température ambiante. Une nouvelle feuille de plastique est ajoutée sur les membranes en évitant la formation de bulles d'air. Les membranes sont maintenant prises en « *sandwich* » entre les deux feuillets plastiques. Les membranes en *sandwich* sont transférées vers le système d'imagerie par chimiluminescence. Les facteurs angiogéniques sont ainsi détectés par chimiluminescence à l'aide d'une caméra CCD (Las-1000 Plus, Intelligent Dark Box II, Fujifilm, Tokyo, Japan). Le signal d'intégration des images est de 20 sec.

CHAPITRE III : DÉVELOPPEMENT ET OPTIMISATION D'UNE BIOENCRE

Ce chapitre a pour objectif de présenter l'évolution des paramètres clés définis dans un cahier des charges complexe, permettant de répondre au développement d'une bioencres idéale pour la bioimpression de tissus vivants. L'utilisation de collagène issu de méduse mais aussi de collagène humain de type I grade médical pour la formulation d'une bioencres sera d'abord présentée. Enfin, le développement d'une bioencres finale composée de trois biomatériaux naturels ainsi que l'utilisation d'une solution de consolidation optimale, seront détaillés.

I. Contexte et objectifs

La bioencres est un élément central de la biofabrication tissulaire par bioimpression 3D. En effet, elle doit répondre à plusieurs contraintes essentielles, permettant :

- Le mélange avec des cellules
- La survie cellulaire lors du processus d'impression
- La tenue mécanique de l'objet durant l'impression
- Le maintien de l'objet durant la culture à 37°C
- Le développement cellulaire

Ainsi, pour que la bioencres puisse répondre à ces propriétés, il est nécessaire d'étudier :

- La rhéologie de la bioencres
- L'imprimabilité de la bioencres grâce à la mise en place de procédés ad hoc
- La croissance cellulaire et la maturation tissulaire

Le choix des biomatériaux pour formuler la bioencres représente donc un paramètre clé pour permettre de répondre à un cahier des charges complexe et précis (Figure 49). En effet, pour mimer au maximum un environnement favorable au développement cellulaire, il convient de reproduire au maximum l'environnement *in vivo*, composant les tissus et organes du corps humain.

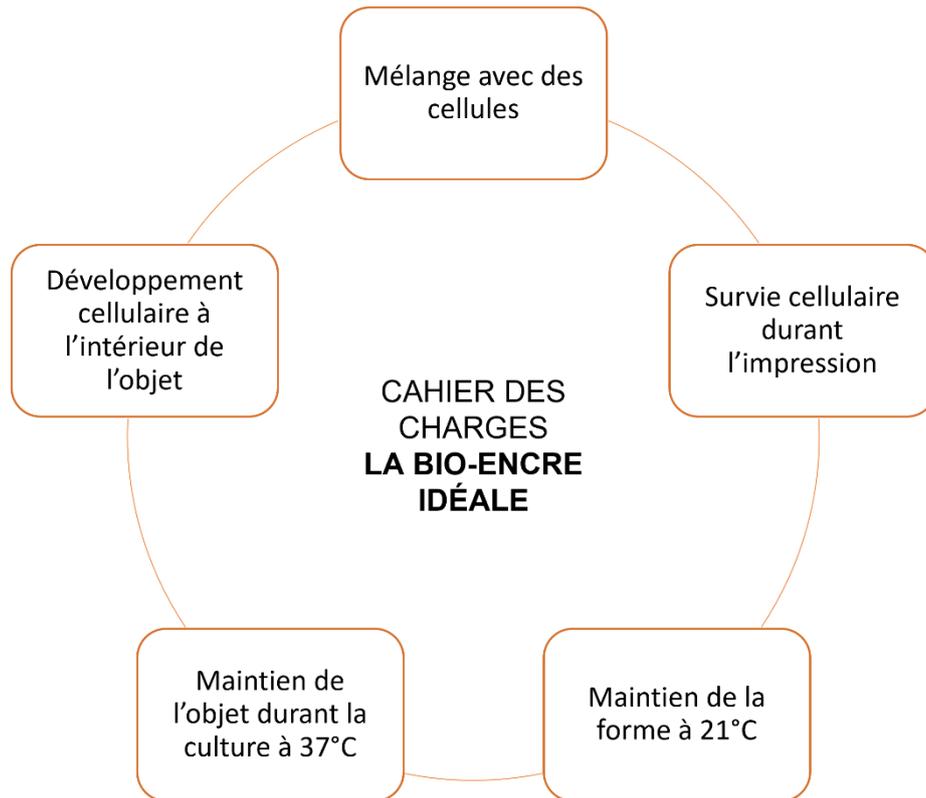


Figure 49 Cahier des charges présentant les paramètres clés auxquels une bioencre doit répondre pour permettre la biofabrication de tissus vivants par bioimpression 3D.

Plusieurs bioencres différentes seront présentées durant ce chapitre :

- Une bioencre composée de collagène de méduse
- Une bioencre composée de collagène de type I humain grade médical
- Une bioencre basée sur la composition d'une précédente bioencre développée au sein du laboratoire⁴³⁴, composée de gélatine, d'alginate et de fibrinogène.

II. Bioencre de collagène issu de méduse

I.1. Etude de formulation

La première étude de développement d'une bioencre s'est basée sur l'utilisation de collagène. Pour cela, nous avons étudié la formulation d'une bioencre composée de collagène issu de méduse, fournit par la société Jellagen®. Ce collagène d'origine marine permet une utilisation dans un grand nombre d'applications comme alternative à l'utilisation de collagène mammifère⁴³⁵.

Durant cette étude, deux types de produits commercialisés par Jellagen® ont été utilisés :

- le JellaGel™ sous forme solubilisée
- le *Jellyfish Collagen* sous forme lyophilisée

Le JellaGel™ est commercialisé sous forme d'une solution dont la gélification est effective par élévation du pH. Celui-ci implique d'abord l'ajout d'une solution de rouge de phénol (Figure 50A), puis l'utilisation d'une solution d'hydroxyde de sodium de concentration 2M (NaOH) permettant d'ajuster la solution à pH 7,4 (Figure 50B). Une étape d'agitation de 30 minutes est nécessaire pour l'homogénéisation de la solution puis une stabilisation pendant au moins 1h à 37°C, sans agitation, permet la formation d'un hydrogel de collagène (Figure 50C).

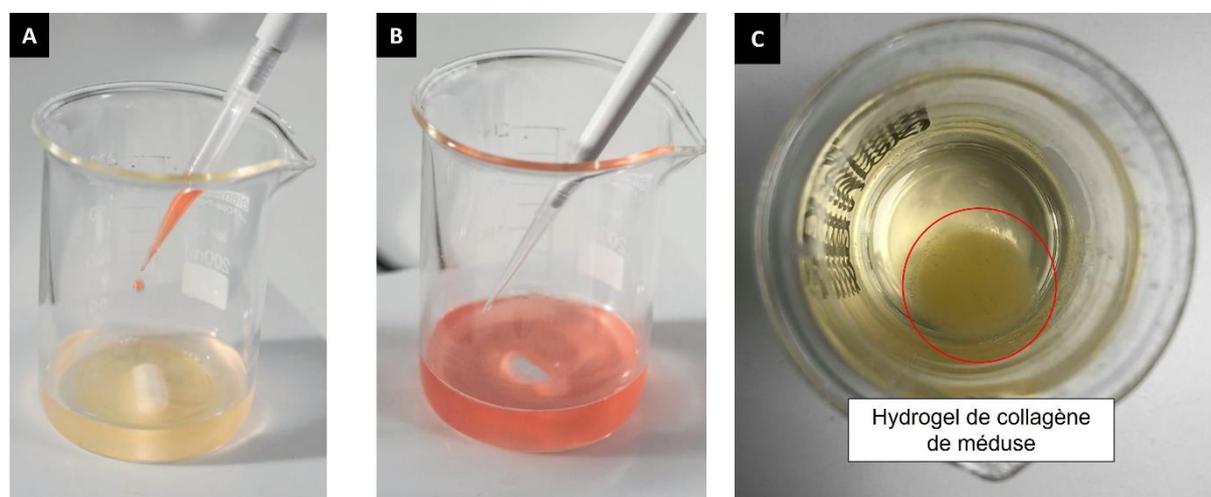


Figure 50 Etape de préparation de l'hydrogel JellaGel™ à base de collagène de méduse. **(A)** ajout du rouge de phénol, **(B)** ajout de la solution de NaOH, **(C)** formation d'un hydrogel de collagène de méduse après incubation d'1h à 37°C.

Concernant le collagène de méduse initialement sous forme lyophilisée, pour être utilisé comme composant d'une bioencres, il doit être sous forme de solution. Pour cela, il est solubilisé à une concentration finale de 6 mg/mL dans une solution d'acide acétique 0,1 M. Un des avantages de ce collagène de méduse est sa préparation à température ambiante (21°C) permettant une facilité des conditions expérimentales par rapport au collagène de mammifère qui se travaille à froid (4°C).

I.2. Limitations et solutions

Plusieurs inconvénients ont été identifiés lors de l'utilisation de ces différents produits. Concernant le JellaGel™ sous forme solubilisée, l'utilisation de plusieurs solutions additives au produit initial, nécessaires à sa gélification, est un frein à son utilisation. Ensuite, la formation nécessaire de l'hydrogel dans un bécher rend difficile l'étape de transfert de la bioencres dans une seringue d'impression. Et enfin, l'impossibilité de mélanger des cellules dans cette bioencres, du à la présence de solution acide, ne nous permet pas de formuler une bioencres cellularisée avant le développement de hydrogel. Ce produit ne permet pas de répondre au cahier des charges que nous avons établi précédemment.

Au niveau de l'utilisation du *Jellyfish Collagen* sous forme lyophilisée, l'étape de solubilisation dans une solution d'acide acétique, ne permet pas, là encore, un mélange avec des cellules. De plus, plusieurs lots ont été testés, pour répondre à un besoin de reproductibilité lors de la formulation d'une bioencres. Malheureusement d'un lot à un autre, les solutions de collagène obtenues n'étaient pas identiques, soit très liquides, soit hétérogènes avec la présence d'agrégats et un ajustement du pH avec un volume de solution d'acide acétique toujours différent. Ces inconvénients sont des limitations majeures pour le développement d'une bioencres, ne répondant pas à notre cahier des charges,

Le Tableau 7 résume les limitations rencontrées durant l'utilisation de collagène de méduse pour la formulation d'une bioencres, ainsi que les solutions à apporter.

Tableau 7 Récapitulatif des limitations rencontrées lors de l'utilisation de collagène issu de méduse et les solutions à mettre en place.

LIMITATIONS IDENTIFIEES	SOLUTIONS A APPORTER
Solubilisation dans des solutions acides, toxiques pour les cellules	Polymère ne nécessitant pas une phase d'acidification
développement d'un hydrogel avant l'ajout de cellules	Formulation d'une bioencres liquide pour l'ajout de cellules et le transfert dans une seringue d'impression
Lot dépendant	Biomatériaux reproductibles

Les paramètres du cahier des charge auxquels répond (vert) ou non (rouge), le collagène de méduse, sont présentés sur la Figure 51. Nous pouvons ainsi constater qu'aucun de nos critères n'est respecté. Ce produit ne peut donc pas être utilisé dans notre étude de développement.

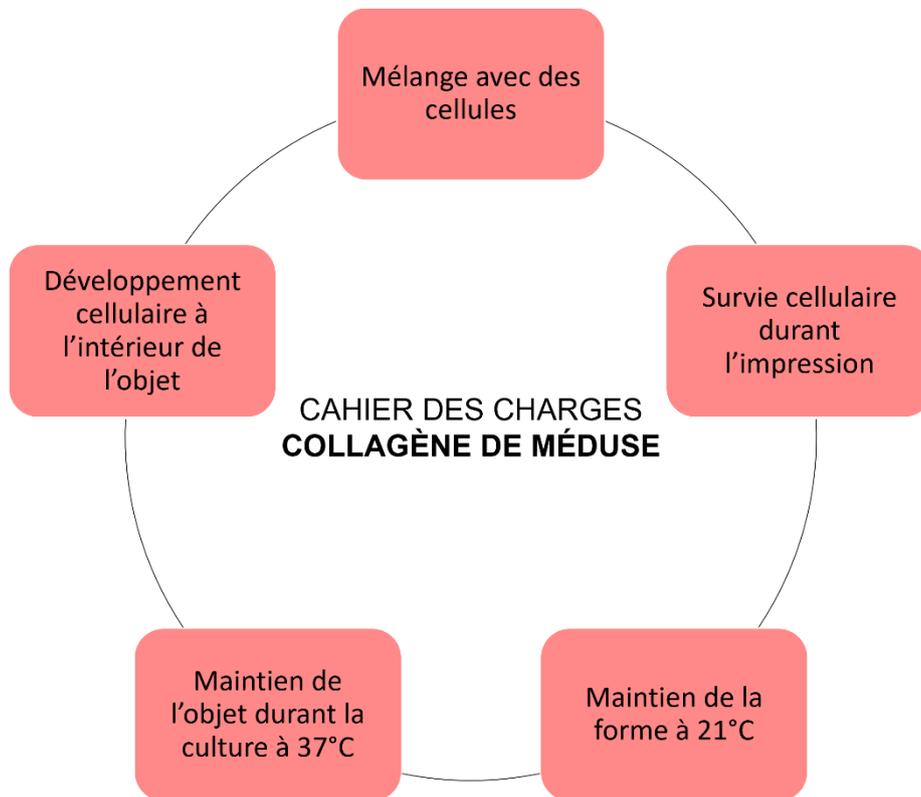


Figure 51 Paramètres auxquels répond (vert), ou ne répond pas (rouge), le collagène de méduse pour la formulation d'une bioencres.

Pour essayer de répondre à ce cahier des charges et toujours dans l'optique d'utiliser du collagène lors du développement de notre bioencres, nous avons réalisé une étude de formulation basée sur l'utilisation de collagène de type I humain, grade médical.

II. Bioencre de collagène humain de type I

II.1. Etude de formulation

Au cours de cette étude, nous avons utilisé un mélange de deux biomatériaux : des microparticules de collagène de type I humain (diamètre inférieur à 200 μm) et des microparticules de chondroïtine sulfate (diamètre inférieur à 80 μm). En effet, ces biomatériaux nous ont été fournis par l'entreprise Biom'Up, spécialisée dans l'hémostase chirurgicale.

Le collagène et la chondroïtine sulfate (CS) sont les deux composants de leur produit commercialisé, Hemoblast™ Bellows, une poudre hémostatique conçu pour simplifier les pratiques des chirurgiens lors d'hémorragies opératoires. Cette étude s'est donc basée sur la transformation de cette poudre de microparticules mélangées de collagène et de chondroïtine sulfate, en une bioencre imprimable, répondant à notre cahier des charges.

Dans un premier temps, des tests d'imprimabilité nous permettant de déterminer les proportions idéales de collagène et de chondroïtine sulfate, ont été défini. Un mélange de collagène et de CS respectant un ratio de 90/10 (m/m) a été utilisé. Les poudres sont ensuite mélangées à l'aide d'une spatule stérile, à une solution physiologique de NaCl à une concentration de 50 mM puis la bioencre est chargée dans une cartouche d'impression et extrudée à 21°C. Sur la Figure 52 nous pouvons observer plusieurs objets imprimés. Un modèle d'oreille a été choisi car il possède un grand surplomb ce qui nous permet de déterminer si une encre possède un seuil suffisant pour ne pas s'effondrer lors de l'impression de structures complexes. Enfin, nous pouvons observer que la composition en biomatériaux 90/10 (m/v) est celle nous permettant d'avoir une meilleure définition de l'objet. En effet, lors de l'impression des autres structures avec des concentration en collagène différentes, des irrégularités due à une mauvaise solubilisation des microparticules de collagène, ont été observées.

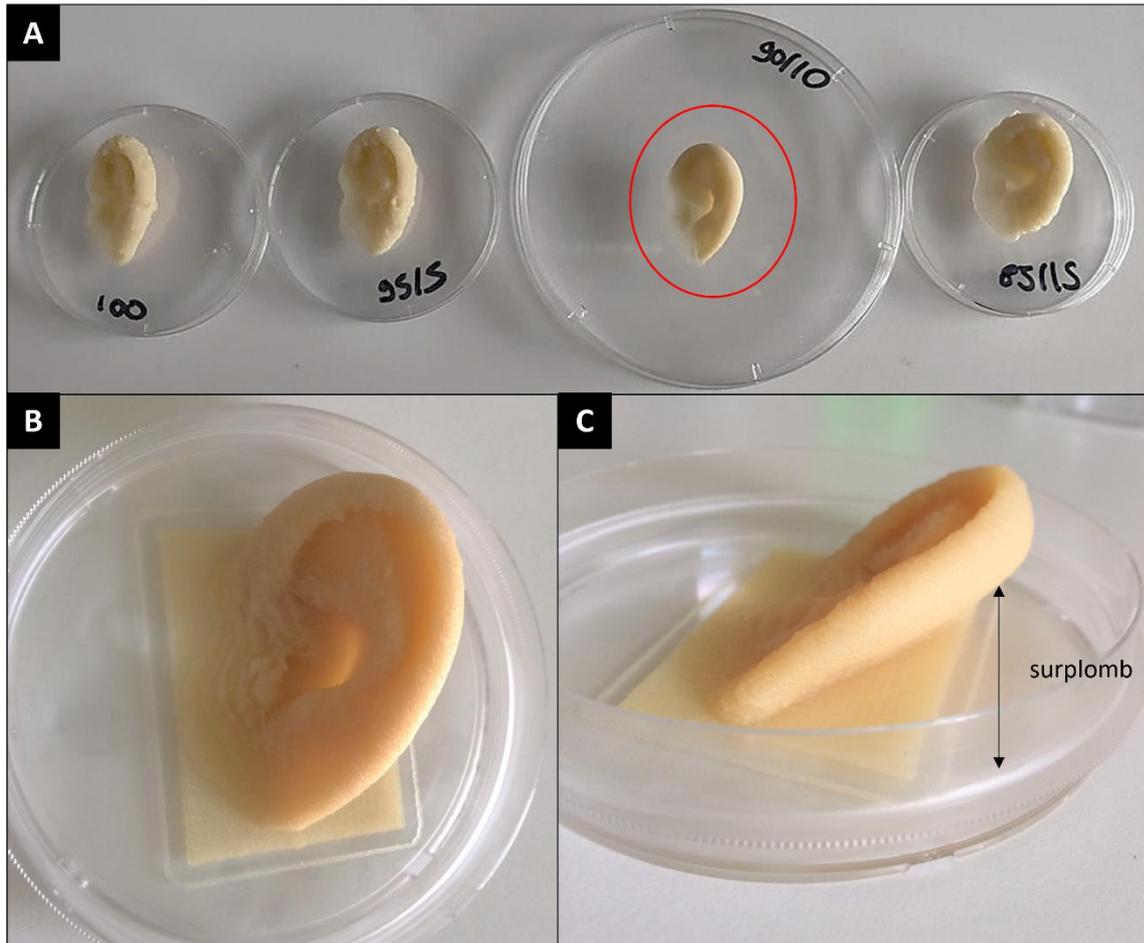


Figure 52 Forme complexe d'oreille bioimprimée avec la bioencres à base de collagène humain de type I de Biom'Up®. Structure très complexe permettant de juger des capacités d'imprimabilité d'une bioencres.

II.2. Amélioration du procédé de formulation

II.2.1. Stabilité de l'objet après impression

Après avoir déterminé la concentration idéale de collagène nous permettant d'imprimer des objets de bonne définition, nous avons évalué sa stabilité lorsqu'il est cultivé dans une solution aqueuse comme le milieu de culture, à température physiologique (37°C).

La bioencres telle quelle n'a pas pu être maintenue en culture et une dissolution de l'objet a été observée en seulement quelques heures. En effet, aucune étape de consolidation des biomatériaux n'a été réalisée après l'impression.

Pour contourner ce problème, la solution de NaCl permettant de solubiliser les biomatériaux, a été remplacée par une solution d'alginate à une concentration de 4 % (m/v). L'ajout de ce

biomatériau va permettre d'apporter de la stabilité à l'objet grâce à sa réaction de chélation en présence d'ions calcium *via* l'utilisation d'une solution de consolidation de CaCl₂ à une concentration de 3 % (m/v).

II.2.2. Mélange avec des cellules

i. Utilisation du système de centrifugation

La bioencre est imprimable, la structure 3D peut maintenant se maintenir durant une mise en culture à 37°C, des cellules vont à présent être ajoutées pour permettre la formulation finale d'une bioencre. Cependant, l'encre actuelle étant très granuleuse due à la présence de microparticules, la suspension cellulaire ne peut pas y être ajoutée simplement sans causer de mortalité cellulaire.

Afin d'effectuer l'ensemencement des cellules dans cette encre, nous avons développé une méthode utilisant une étape de centrifugation. Pour cela, les microparticules de collagène et de CS, mesurant entre 150 et 200 µm de diamètre, ont été dans un premier temps solubilisées dans 20 mL de solution d'alginate à une concentration de 4 % (m/v) contenant préalablement des NIH 3T3 GFP (500 000 cellules/mL). Ce mélange dans un volume important, nous permet de solubiliser plus facilement les microparticules de biopolymères sous faible agitation, sans utilisation de spatule pour réaliser le mélange et qui reste inapproprié pour le mélange de cellules. Cependant, à cette étape, la bioencre ne possède pas les propriétés rhéologiques suffisantes pour être imprimée, car trop liquide. Une étape de centrifugation est alors réalisée, permettant ainsi de mélanger les microparticules avec la solution cellulaire d'alginate tout en les sédimentant au fond du tube. Le surnageant est ensuite retiré puis la bioencre est transférée dans une seringue d'impression pour être bioimprimée.

Cependant, après 3 jours de culture, aucune cellule vivante n'est identifiée à l'intérieur de l'objet (Figure 53). L'étape de centrifugation semble donc engendrer une forte mortalité cellulaire non compatible avec notre cahier des charges.

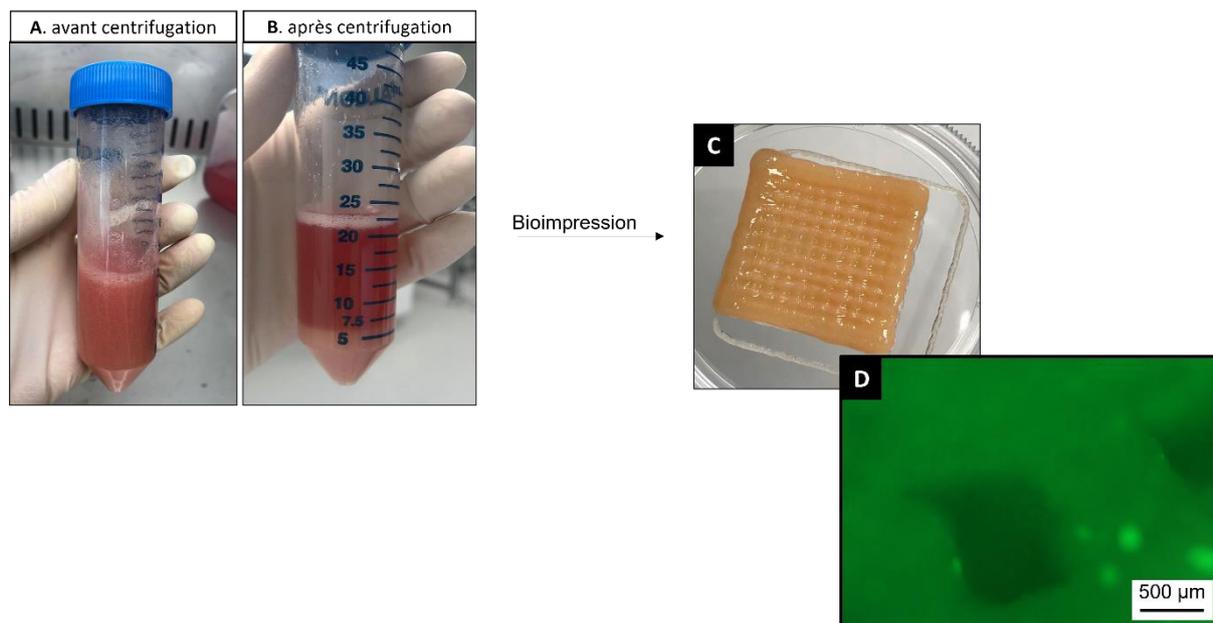


Figure 53 Principe de mélange des poudres et de la suspension cellulaire par centrifugation. **(A)** mélange des cellules avec les microparticules de collagène et de CS dans un grand volume d’alginate. **(B)** Centrifugation de la solution avec sédimentation des microparticules de collagène et de CS. **(C)** Photo d’un objet 3D directement après bioimpression. **(D)** Observation par microscopie de fluorescence des cellules NIH à l’intérieur de l’objet 3D après 3 jours de culture. Aucune fluorescence n’est constatée. Barre d’échelle 500 μm .

Une nouvelle méthode permettant de cellulariser cette encre à base de microparticules de collagène et de chondroïtine sulfate doit alors être étudiée. Pour cela nous avons utilisé la technique de biofabrication par bioimpression 3D coaxiale.

ii. Utilisation d’un système coaxial

La seconde technique étudiée pour répondre au problème de mélange de cette encre avec des cellules, est celle de la bioimpression 3D coaxiale. En effet, cette technique a pour avantage de permettre l’utilisation de deux formulations d’encres différentes de manière concomitante grâce à l’utilisation d’une buse d’extrusion spécifique. Pour cela nous avons formulé deux bioencres différentes que nous avons chargées dans deux seringues différentes, permettant de séparer les microparticules de biopolymères de la suspension cellulaire :

- une 1^{ère} bioencre, composée d’une solution d’alginate de concentration 4 % (m/v) mélangée à une suspension cellulaire de NIH 3T3 GFP (250 000 cellules/mL).
- une 2^{nde} bioencre, composée des microparticules de collagène et de CS solubilisées dans une solution de polymérisation de CaCl_2 de concentration 3 % (m/v) à l’aide d’une

spatule pour bien homogénéiser la bioencre (pas de présence de cellule dans cette bioencre)

Une buse coaxiale spécifique a été utilisée, nous permettant d'extruder les deux bioencres en même temps (Figure 54A). Comme nous pouvons le constater sur la Figure 54B, cette méthode permet de créer un objet 3D avec une bioencre « enrobée » par la seconde bioencre. Dans notre cas, la bioencre de collagène et de CaCl_2 sera enrobée par la bioencre d'alginate cellularisée.

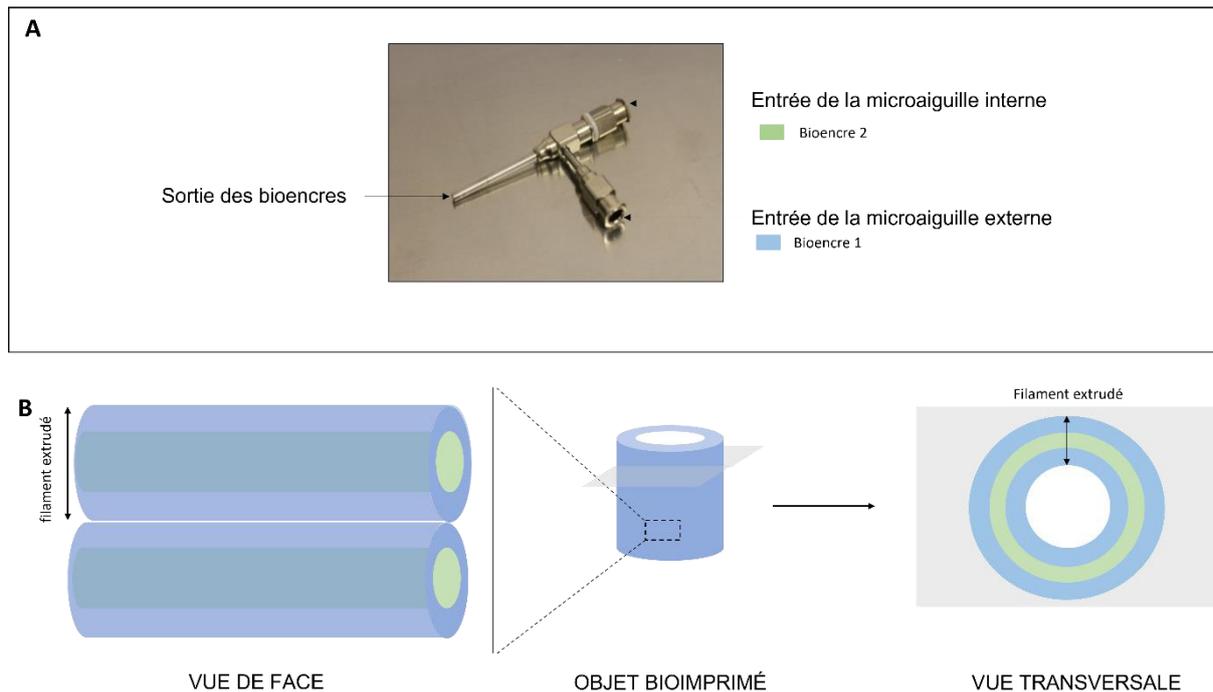


Figure 54 Représentation schématique du principe de bioimpression coaxiale. **(A)** Image d'une buse coaxiale possédant deux entrées permettant d'extruder deux bioencres différentes de manière concomitante. **(B)** Schéma du principe de bioimpression coaxiale avec une vue transversale et une vue de face des structures multi-bioencres formées à l'intérieur d'un objet 3D.

Les deux seringues de bioencre sont connectées à la buse coaxiale et extrudées en même temps. La bioencre formulée à partir de collagène, de CS et de CaCl_2 est extrudée à l'intérieur de la bioencre composée d'alginate et de cellules, permettant la chélation instantanée de la solution d'alginate grâce au CaCl_2 . Ce phénomène permet une stabilité de l'objet durant la bioimpression. La bioencre composée de collagène et CS se retrouve donc « piégée » à l'intérieur d'une coque d'alginate cellularisée et agit comme un agent consolidant de l'objet.

Plusieurs dimensions de buses ont été testées. La buse de modèle 1410 (Figure 55A) possédant les diamètres les plus larges de notre étude ne possédait pas une résolution d'impression suffisante. La buse 2218 possédant les diamètres les plus faibles, ne nous a pas permis d'extruder la bioencres d'alginate. En effet, des conditions expérimentales nécessitant des pressions très élevées sont nécessaires pour l'extrusion, cependant cette pression entrainera des contraintes de cisaillement élevées et par conséquent une viabilité cellulaire très réduite. Ce fut donc la buse coaxiale de modèle 1814 (Figure 55B) qui nous a permis de bioimprimer des structures tubulaires possédant une paroi de 1 mm et une hauteur de 6 cm. En effet, grâce à ce système de bioimpression coaxiale des structures tubulaires de parois fines et de hauteurs centimétriques sont possibles (Figure 55C). Une structure tubulaire a pu être maintenue en culture pendant 7 jours dans du milieu de culture tout en gardant sa morphologie (Figure 55D). La réaction de chélation de l'alginate est donc effective et permet un maintien de la structure bioimprimée tout au long de sa culture.

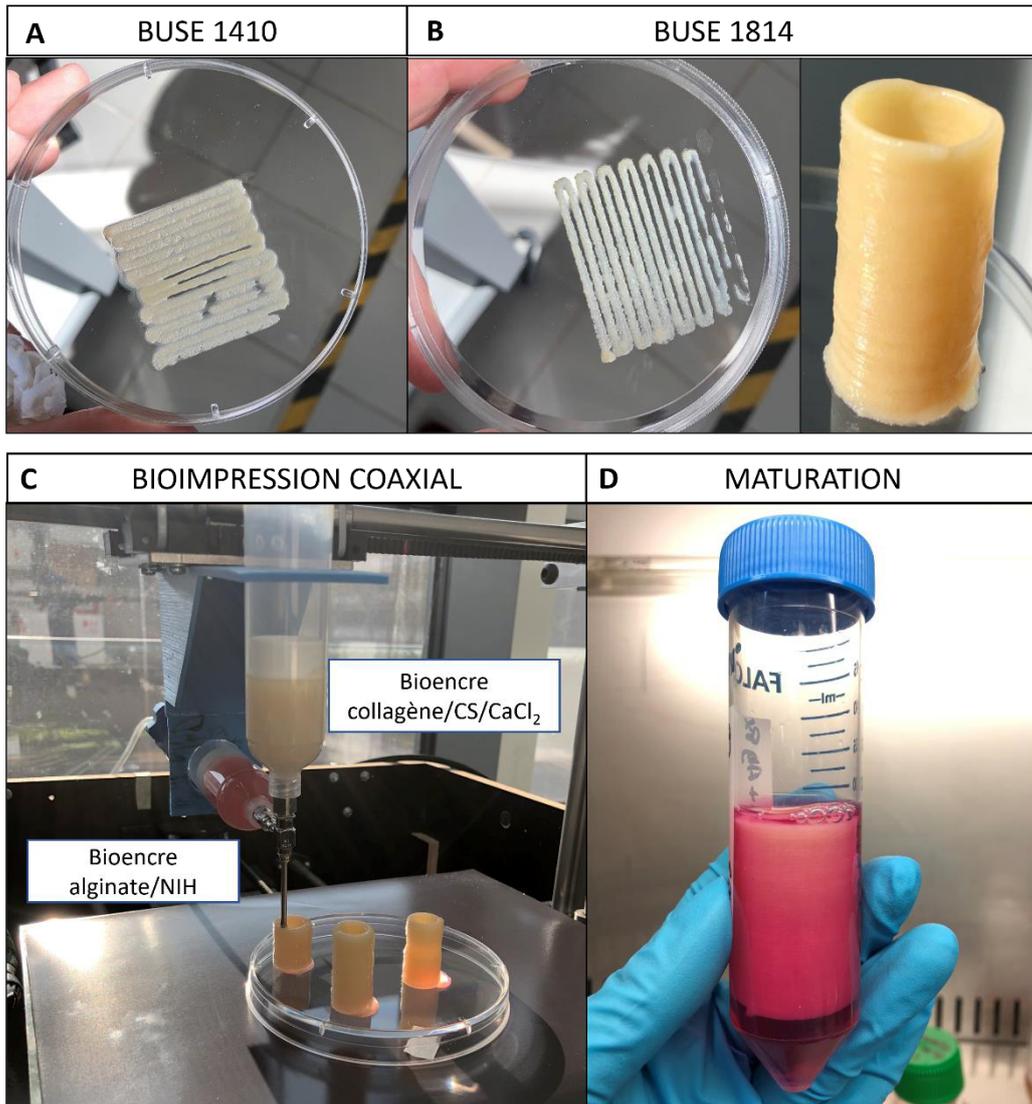


Figure 55 Bioimpression 3D coaxiale de microparticules de collagène. **(A)** Essai d'extrusion de filaments *via* l'utilisation d'une buse de modèle 1410 (gros diamètres). **(B)** Essai d'extrusion de filaments de bioencre *via* l'utilisation d'une buse de modèle 1814. **(C)** Image du principe de bioimpression 3D coaxiale d'une bioencre d'alginate cellulaire et d'une bioencre de collagène, CS et CaCl₂. **(D)** Tenue mécanique de l'objet 3D bioimprimé après 7 jours de culture.

Afin d'identifier la présence de cellules dans notre structure tubulaire 3D, des caractérisations histologiques ont été réalisées. Pour cela, une coupe transversale d'un tube a été effectuée afin d'observer les différentes couches formées par bioimpression coaxiale.

D'après la Figure 56, nous pouvons remarquer la formation d'une couche centrale de collagène et de CS et d'une couche périphérique composée d'alginate. Des cellules NIH sont présentes dans la couche d'alginate après 1 jour de culture (indiquées par des flèches rouges)

(Figure 56A). Aucune cellule n'est observée dans la partie composée de collagène et CS, ce qui est normal car l'encre n'était pas cellularisée lors de la bioimpression (Figure 56B).

Après 6 jours de culture, nous pouvons constater une absence de cellules dans la couche d'alginate (Figure 56D) mais la présence de cellules, cette fois-ci, dans la couche composée de collagène et CS (Figure 56E). Cela s'explique par l'absence de motifs d'adhésion cellulaire dans le polymère d'alginate utilisé, ne permettant pas aux cellules d'y adhérer après bioimpression. Celles-ci vont alors migrer vers le collagène, renfermant des motifs RGD d'adhésion cellulaire, permettant aux cellules NIH d'y adhérer.

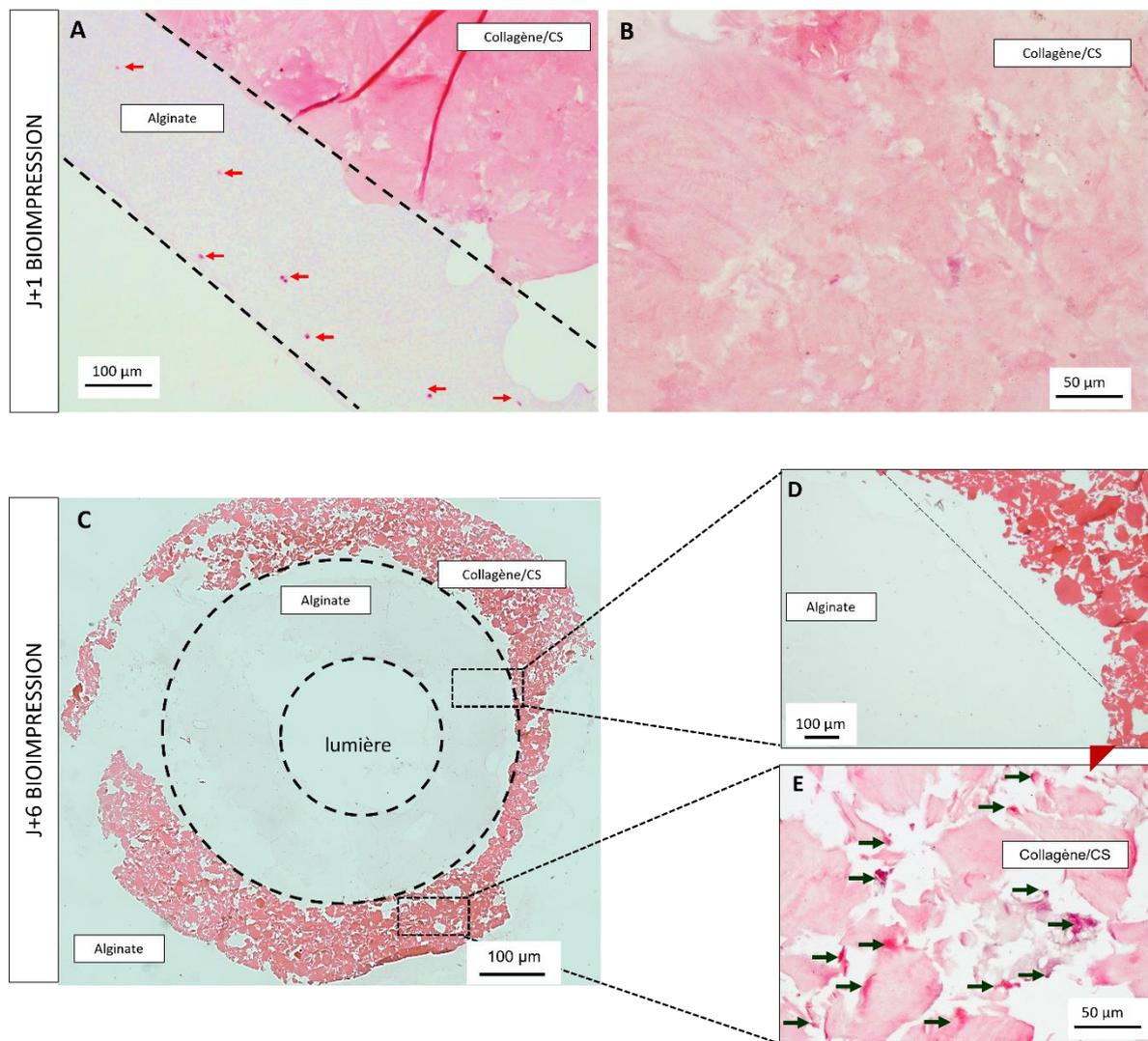


Figure 56 Analyses histologiques des structures tubulaires bioimprimées en coaxiale. **(A)** Présence de cellules dans la couche composée d'alginate (flèches) après 1 jours de culture (barre d'échelle 100 µm). **(B)** Absence de cellules dans la couche de collagène/CS après 1 jours de culture (barre d'échelle 50 µm). **(C)** Image de la coupe transversale d'une structure tubulaire avec une couche composée de collagène/CS au cœur de deux couches composées d'alginate (parties claires) (barre d'échelle 100 µm). **(D)** Absence de cellules dans la couche composée

d'alginate après 6 jours de culture (barre d'échelle 100 μm). (E) Présence de cellules dans la couche composée de collagène et CS après 6 jours de culture (barre d'échelle 50 μm).

L'ultrastructure de notre objet 3D bioimprimé a pu être mise en évidence grâce à la microscopie électronique à balayage environnemental (MEBE). Cette technique est privilégiée par rapport au MEB classique car elle permet notamment de conserver l'hydratation de l'échantillon à observer, sans préparation préalable, conservant ainsi un état plus naturel. D'après la Figure 57 nous pouvons observer la nature poreuse de la bioencres composée de collagène et chondroïtine sulfate, favorable à l'adhésion, la prolifération et la migration cellulaire. La couche d'alginate, quant à elle, est beaucoup plus dense et fine.

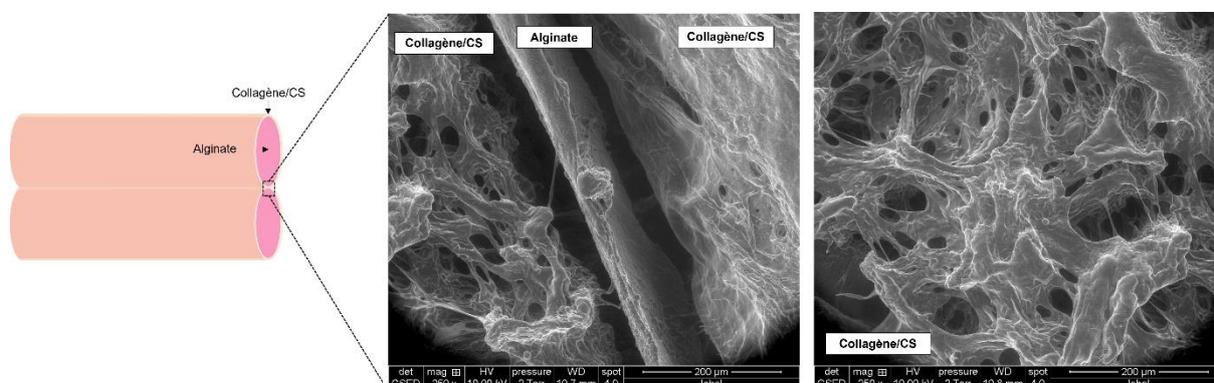


Figure 57 Images de microscopie électronique à balayage environnemental (MEBE) de la structure vasculaire bioimprimée en coaxiale. Les couches d'alginate et de collagène/CS sont nettement identifiables avec la bioencres de collagène/CS présentant une morphologie poreuse. Image réalisée sur un objet entier (barre d'échelle 200 μm)

Cette dernière méthode nous a alors permis de répondre un des paramètres clés du cahier des charges, le mélange des biomatériaux avec les cellules. En effet, les cellules ne pouvant pas être mélangées à des biopolymères sous forme de microparticules, l'approche coaxiale nous permet d'utiliser une bioencres intermédiaire permettant d'assurer le maintien de la viabilité cellulaire durant l'étape de préparation et de bioimpression, puis après bioimpression, les cellules vont migrer vers le collagène possédant des motifs d'adhésion cellulaire.

Les limitations et les solutions apportées pour répondre à notre cahier des charges sont résumées dans le Tableau 8.

Tableau 8 Récapitulatif des limitations rencontrées en utilisant une bioencres formulée à partir de collagène de type I humain grade médical, et les solutions à apporter

LIMITATIONS RENCONTREES	SOLUTIONS APORTEES OU FUTURES
Pas de stabilité de l'objet lors de la culture à 37°C	Ajout d'une solution d'alginate permettant la consolidation de l'objet après chélation avec une solution de CaCl ₂
Impossibilité de mélanger des cellules avec les microparticules de biopolymères	Méthode de mélange par un <i>lueur-lock</i> : NON Mélange par centrifugation : NON Bioimpression co-axial : OUI
Technique de bioimpression limitée au co-axial avec l'utilisation obligatoire d'une bioencres intermédiaire servant de support cellulaire durant l'impression	Biomatériaux solubles facilement, permettant d'être utiliser directement avec les cellules

Des limitations sont tout de même encore présentes. La biofabrication d'un objet cellularisé en utilisant une bioencres de microparticules de collagène par la méthode de bioimpression coaxial, ne nous permet pas de fabriquer des objets de compositions complexes. En effet, pour la transposition à l'ingénierie macrovasculaire où la composition de la paroi vasculaire est essentielle, cette approche ne nous permettra finalement que de créer une couche cellularisée et non pas plusieurs couches différentes. Les microparticules de collagène engendrant des contraintes de cisaillement sur les cellules durant le mélange, il ne sera jamais possible d'ajouter une suspension cellulaire directement à ce biomatériau.

Le choix d'utilisation du collagène sous forme de microparticules, pour la formulation de notre bioencres, ne répond donc pas suffisamment aux propriétés clés de notre cahier des charges (Figure 58).

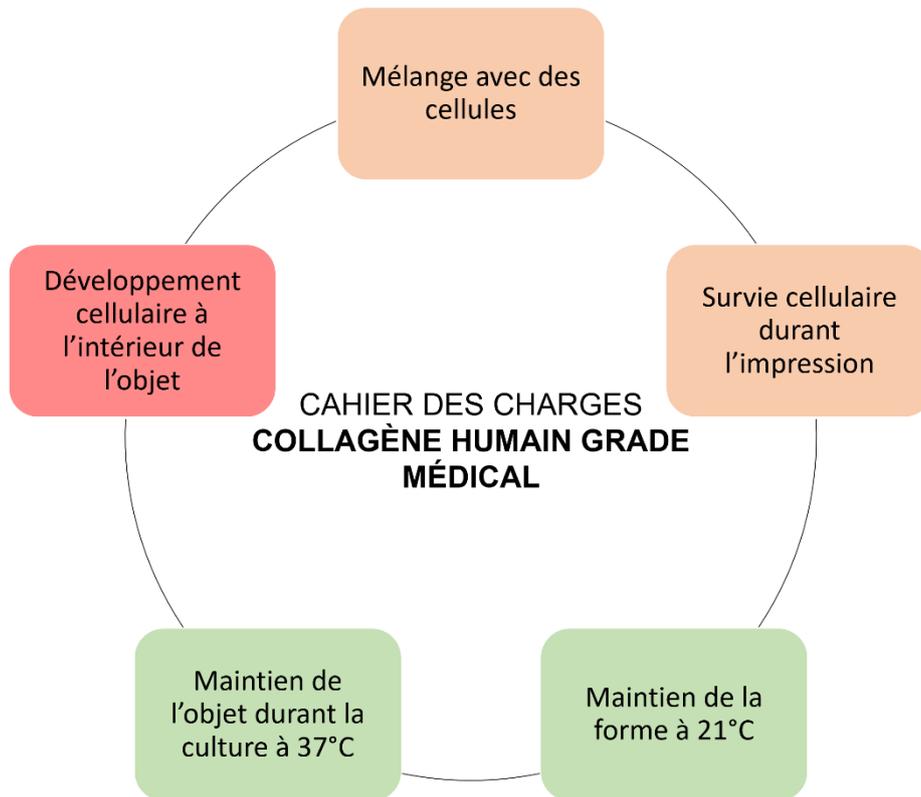


Figure 58 Paramètres clés auxquels répond (vert), ne répond pas (rouge), ou sont à optimiser (orange), le collagène humain grade médical sous forme de microparticules, pour la formulation d'une bioencres.

III. La bioencres finale

Une première bioencres fut développée au sein du laboratoire, en 2018^{434,436}. Celle-ci se compose d'un mélange de trois biomatériaux : la gélatine à une concentration de 10 % (m/v), l'alginate à une concentration de 1 % (m/v) et le fibrinogène à une concentration de 2 % (m/v). Ces biomatériaux étaient solubilisés dans une solution physiologique de NaCl à une concentration de 50 mM, puis la bioencres était extrudée à une température de 28°C pour former un objet 3D. Enfin, celui-ci était consolidé grâce à une solution de CaCl₂ à une concentration de 3 % (m/v). Cette bioencres a permis le développement de plusieurs modèles tissulaires comme la peau ou le cartilage⁴³⁶⁻⁴³⁹. Les caractéristiques majeures de cette bioencres développée en 2018 sont résumées dans le Tableau 9.

Tableau 9 Caractéristiques principales et les étapes de préparation, de bioimpression et de consolidation de la bioencres développée en 2018⁴³⁶.

Préparation de la bioencres	Gélatine (<i>concentration finale</i>)	10 % (m/v)
	Alginate (<i>concentration finale</i>)	1 % (m/v)
	Fibrinogène (<i>concentration finale</i>)	2 % (m/v)
	Solubilisée dans :	NaCl 0,9 % (m/v)
Bioimpression	Température d'extrusion	28°C
	Plateau d'impression	4°C
Consolidation	Composition	[CaCl ₂] = 165 mM [Thrombine] = 20 U/mL
	Solubilisée dans	Eau milliQ

Aujourd'hui, l'utilisation de cette bioencres laisse apparaitre plusieurs inconvénients :

- La température d'extrusion de 28°C : à cette température, les couches de bioencres extrudées nécessitent un refroidissement instantané, permettant à l'objet formé de se stabiliser. Le plateau support d'impression doit alors être refroidi à 4°C, initiant une gélification des couches de bioencres au fur-et-à-mesure de la bioimpression. Plus l'objet imprimé possèdera une hauteur de couche importante, plus celles-ci se

retrouveront éloignées du plateau à 4°C et l'effet de stabilisation de l'objet ne sera plus assuré.

- La préparation des biomatériaux dans une solution de NaCl, non favorable à la viabilité cellulaire. En effet les cellules dans la bioencres se retrouvent dans un environnement dépourvu de leur milieu de culture pendant une longue durée, allant de la préparation de la bioencres, la bioimpression, la consolidation, jusqu'à la mise en culture à 37°C. Ces étapes sont de l'ordre de plusieurs heures et impactent véritablement la viabilité cellulaire.
- La consolidation de l'objet dans une solution de CaCl₂ à une concentration de 165 mM solubilisée dans de l'eau, est non favorable à la viabilité cellulaire. En effet, le calcium jouant un rôle majeur dans la machinerie et la régulation des fonctions cellulaires. Une quantité beaucoup trop élevée par rapport aux concentrations physiologiques (d'environ 1,6 mM) est hautement toxique et peut induire des modifications des voies de signalisation cellulaires allant jusqu'à la mort. De plus, la solubilisation de cette solution dans de l'eau induit des pressions osmotiques importantes pouvant créer un choc osmotique cellulaire et donc la mort^{440,441}.

Les limitations observées lors de l'utilisation de la bioencres initiale ainsi que les solutions que nous avons apportées pour permettre de répondre au cahier des charges sont résumées dans le tableau suivant :

Tableau 10 Résumé des limitations observées lors de l'utilisation de la bioencre initiale et les solutions apportées avec le développement de la nouvelle bioencre.

LIMITATIONS RENCONTREES SUR LA BIOENCRE INITIALE	SOLUTIONS APORTEES AVEC LA NOUVELLE BIOENCRE
Température d'extrusion de 28°C	Température d'extrusion de 21°C
Solubilisation des biomatériaux dans une solution aqueuse de NaCl 0,9 % (m/v), nocive pour les cellules	Solubilisation des biomatériaux exclusivement dans du milieu de culture
Solution de consolidation de concentration élevée en CaCl ₂	Réduction de cette concentration

Les paramètres clés auxquels répond (vert) ou non (rouge) la bioencre initiale développée sont présentés sur la Figure 59.

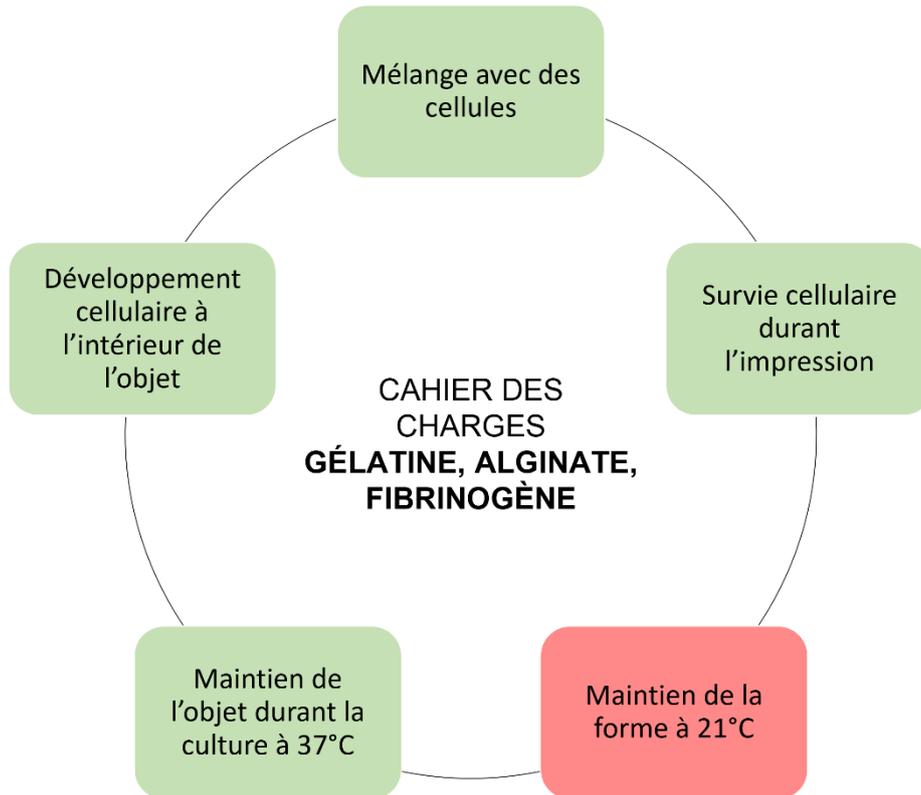


Figure 59 Paramètres clés auxquels répond (vert) ou ne répond pas (rouge), la bioencres initiale développée au sein du laboratoire en 2018.

Pour répondre à ces limitations, nous allons étudier la modification et la reformulation de cette bioencres permettant de répondre à :

- Un écoulement de la bioencres à une température d'extrusion de 21°C
- Un maintien de la forme de l'objet à une température de 21°C durant la bioimpression
- Une viabilité cellulaire augmentée avec l'utilisation de milieu de culture à toutes les étapes.

III.1. La formulation

Le développement de la nouvelle bioencres doit permettre, dans un premier temps, son extrusion à température ambiante, que nous considérons de 21°C. Pour répondre à ce premier paramètre, les concentrations des biomatériaux ont été abaissées, particulièrement celle de la gélatine, permettant ainsi de réduire sa température de gélification à 21°C au lieu de

28°C. Notre bioencres se compose alors de gélatine à une concentration finale de 7,5 % (m/v), d'alginate à une concentration finale de 0,5 % (m/v) et de fibrinogène à une concentration finale de 2 % (m/v).

Par la suite, afin d'améliorer la viabilité cellulaire à l'intérieur de cette bioencres, nous avons décidé de préparer ces solutions de biomatériaux directement dans du milieu de culture. Dans un premier temps, les solutions de gélatine, d'alginate et de fibrinogène ont été formulées dans du milieu de culture DMEM dépourvu de calcium (que nous nommerons par la suite : « DMEM (-) »). En effet, l'absence de calcium dans ce milieu de culture avait pour objectif d'empêcher la chélation de l'alginate ainsi que la formation d'un caillot par le fibrinogène lors de la phase de préparation des biomatériaux avant la bioimpression. Cependant, il a été démontré que lorsque les cellules sont placées dans un milieu dépourvu de calcium puis de nouveau exposées à un milieu chargé en calcium, des dérèglements de voies de signalisation cellulaires pouvant entraîner une apoptose sont observés⁴⁴². Cet effet est assuré lorsque les cellules sont soumises à des contraintes de cisaillement pouvant endommager leurs membranes, un phénomène classique lors de la bioimpression par extrusion.

Les solutions de biomatériaux ont donc été préparées dans du milieu de culture DMEM classique, dont la concentration en CaCl_2 à l'intérieur est de 1,45 mM, correspond à une concentration extracellulaire de CaCl_2 standard pour une cellule. Nous nommerons ce milieu de culture DMEM avec calcium, « DMEM (+) ».

Pour s'assurer de la solubilisation homogène et totale de nos biomatériaux, un premier essai a été réalisé lors de la préparation standard des biomatériaux. Les différents biomatériaux sous forme de poudre, la gélatine, l'alginate et le fibrinogène ont été solubilisés indépendamment les uns des autres dans du DMEM (+) afin d'étudier leur comportement face au milieu de culture mais principalement face à un milieu de culture contenant du calcium. Les solutions de biomatériaux ont alors été incubées à 37°C, reproduisant ainsi la 1^{ère} étape de préparation de la bioencres. Après 48h d'incubation à 37°C, les solutions d'alginate et de fibrinogène, propices à une réaction avec les ions calcium, n'ont pas présenté de phénomène de gélification dû à la présence de DMEM (+) et présentaient un état aussi liquide que lorsqu'elles étaient préparées dans le DMEM (-).

Des caractérisations rhéologiques ont ensuite été effectuées pour étudier le comportement de déformation et d'écoulement de la bioencres formulée dans le DMEM (+) et de la bioencres formulée dans le DMEM (-).

D'après le graphique présenté sur la Figure 60, les deux bioencres préparées dans du milieu de culture sans calcium (DMEM (-)), ou dans du milieu de culture avec calcium (DMEM (+)), possèdent un comportement rhéologique similaire. En effet, ces résultats démontrent un comportement rhéofluidifiant des bioencres avec une viscosité qui diminue lorsque le taux de cisaillement augmente. Cela signifie que lorsqu'une force est appliquée sur la bioencres, celle-ci devient de plus en plus liquide. Cette propriété s'explique par le fait que sous l'effet d'une force, les chaînes de polymères ont tendance à s'aligner progressivement dans le sens de la contrainte et favorise leur glissement relatif. Il est important de noter que ce type de comportement rhéofluidifiant est vital pour les cellulesensemencées dans la bioencres car cela leur permet de diminuer la contrainte de cisaillement qui leur est appliquée et ainsi maintenir une viabilité cellulaire optimale durant la bioimpression⁴³³. Nous pouvons également noter une chute de la viscosité à partir d'un champ à fort taux de cisaillement ($> 10 \text{ s}^{-1}$) traduisant un domaine où le réseau physique de la gélatine est irréversiblement désorganisé. Cela signifie que si une contrainte de cisaillement supérieure à 10 s^{-1} est appliquée, la bioencres sera totalement liquide et ne pourra plus être extrudée.

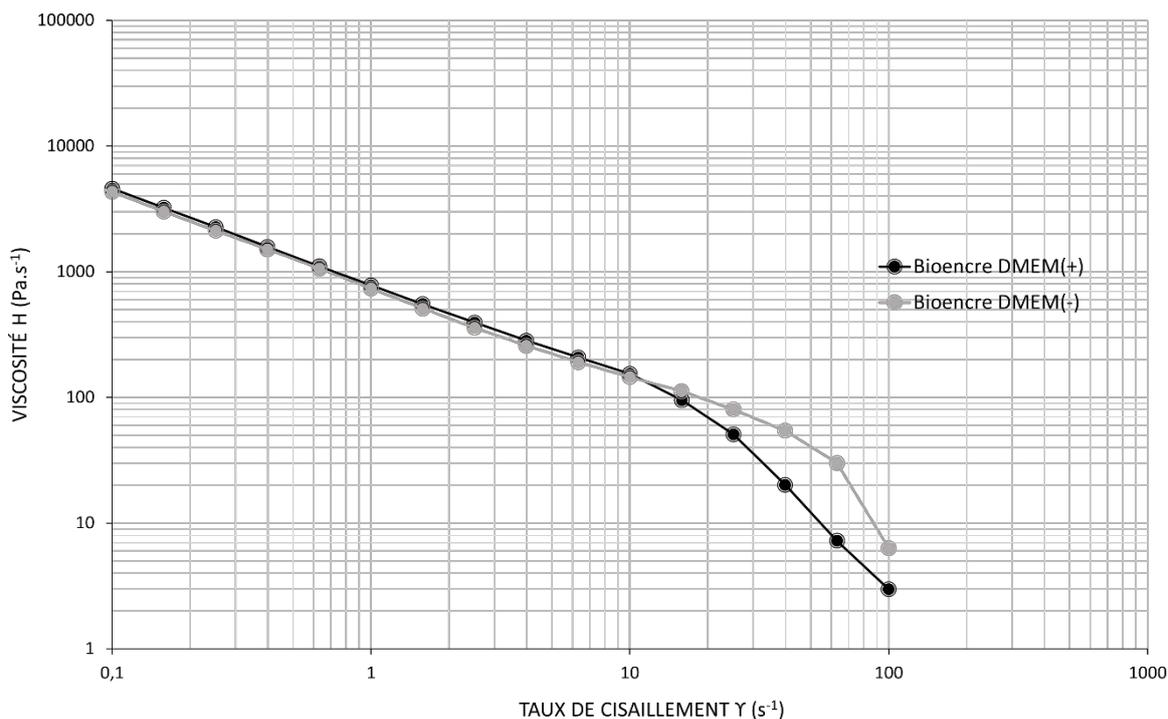


Figure 60 Graphique représentant la viscosité de la bioencre en fonction du taux de cisaillement appliqué. Aucune différence majeure entre la bioencre formulée dans le DMEM (-) ou le DMEM (+) est constatée. Caractérisation du comportement rhéofluidifiant de la bioencre à 21°C.

La dernière étude rhéologique, présentée sur la Figure 61, nous permet de mettre en évidence la présence d'une contrainte seuil. Cette contrainte seuil est définie comme la contrainte minimale à appliquer sur le matériau pour permettre son écoulement à travers l'aiguille d'impression. A faible taux de cisaillement, en dessous de 1.10^{-1} s^{-1} , la contrainte de cisaillement ne permet pas l'écoulement de la bioencre car le matériau reste sous sa forme solide-gel. Cependant, au-delà de ce faible taux de cisaillement, la contrainte de cisaillement appliquée à la bioencre est suffisamment élevée pour rompre les réseaux physiques des matériaux de la bioencre, lui conférant alors un comportement de liquide qui peut être facilement extrudé. La mesure de la contrainte de cisaillement en fonction du taux de cisaillement nous permet de mettre en évidence la contrainte seuil ou limite d'élasticité. Pour les bioencres DMEM (+) et DMEM (-), les contraintes seuil sont respectivement de 460 Pa et de 433 Pa. C'est cette force minimale qui devra être appliquée à la bioencre pour permettre son extrusion à travers la buse d'impression. Nous observons également la chute brutale de la contrainte cisaillement à partir d'un champ à fort taux de cisaillement ($> 10 \text{ s}^{-1}$) pour les deux bioencres, permettant de mettre en évidence, là encore, un domaine où le réseau

physique de la gélatine est irréversiblement désorganisé. La différence observée entre les deux courbes des bioencres n'est pas significative dans notre cas puisque des taux de cisaillement à champ fort ne seront jamais appliqués en bioimpression, responsables d'une forte mortalité cellulaire.

En conclusion, la formulation des biomatériaux dans du milieu nutritif DMEM (-) ou DMEM (+) nous permettra d'extruder les bioencres de manière similaire avec une contrainte de cisaillement faible appliquée sur chacune des bioencres.

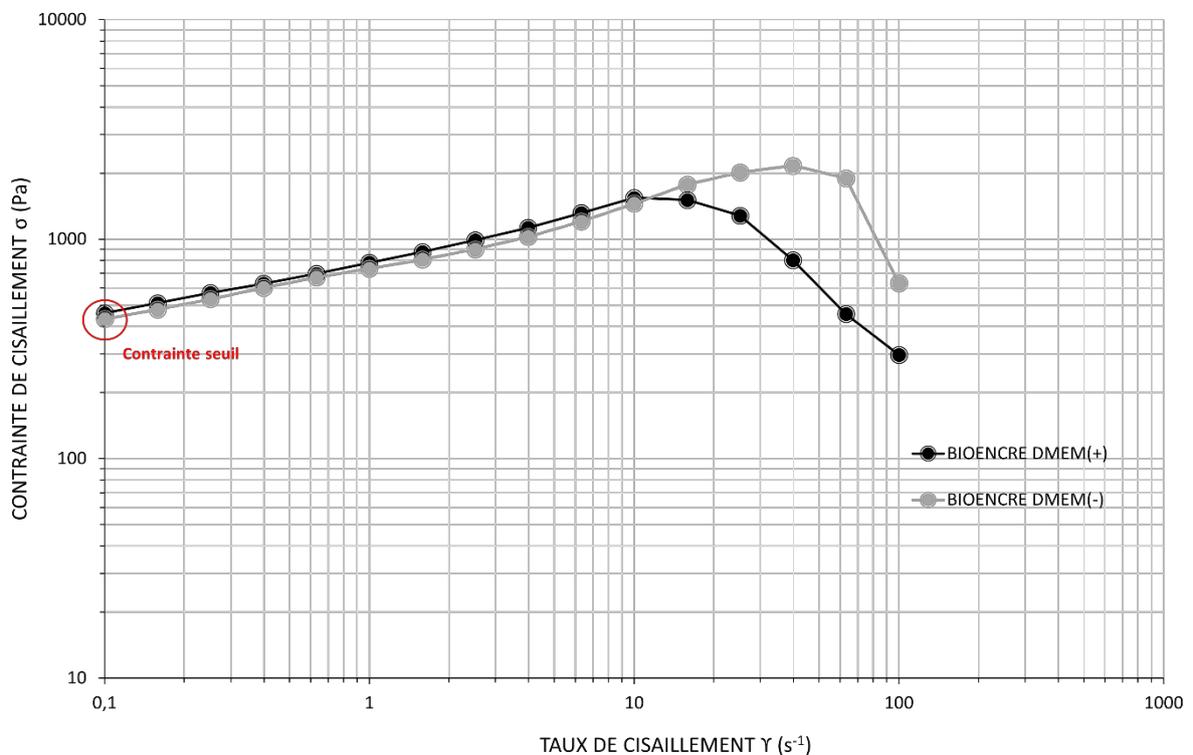


Figure 61 Graphique représentant la contrainte de cisaillement en fonction du taux de cisaillement de la bioencres à 21°C. Détermination de la contrainte seuil de 460 Pa pour la bioencres DMEM (+) et de 433 Pa pour la bioencres DMEM (-).

La solubilisation des biomatériaux dans du milieu de culture, le comportement rhéofluidifiant et la contrainte seuil de notre bioencres ont ainsi été déterminés.

Une étape nécessaire pour la bioimpression est l'imprimabilité de notre bioencres grâce à un changement de phase d'un état liquide, juste après le mélange des biomatériaux, à un état gel, juste avant le processus de bioimpression. En effet, les biomatériaux sont solubilisés dans

du milieu de culture et placés à une température de 37°C, permettant d'obtenir des solutions de gélatine, d'alginate et de fibrinogène liquides pouvant alors être mélangées facilement aux suspensions cellulaires. Une fois la bioencres préparée à partir des biomatériaux et de la suspension cellulaire, celle-ci doit alors passer à un état de gel pour permettre son imprimabilité. Pour cela, une étape de transition thermique de 37°C à 21°C est effectuée. Cette étape permet à la gélatine, le biomatériau thermosensible de la bioencres, d'initier une gélification et une stabilisation de la bioencres.

Pour un volume total de bioencres préparée de 8 mL, nous avons déterminé un temps de gélification de 12 minutes (Figure 62). Par nécessité de reproductibilité lors d'utilisation de volumes plus importants de bioencres pour la bioimpression d'objet de taille importante, nous avons déterminé un temps de gélification de 30 minutes, ce qui reste totalement acceptable pour la survie cellulaire étant donné que celles-ci se trouvent dorénavant dans une bioencres formulée dans leur milieu nutritif.



Figure 62 Photo de la gélification de la bioencres en 12 minutes à 21°C.

III.2. La consolidation

Après l'étape de formulation de la bioencres puis sa bioimpression, il est nécessaire de consolider l'objet bioimprimé pour lui assurer une stabilité lors de la mise en culture à 37°C.

Cette solution de consolidation est formulée à partir d'une solution de CaCl_2 , permettant de consolider l'alginate par une réaction de chélation et d'une solution de thrombine permettant d'initier l'auto-assemblage du fibrinogène en un réseau de fibrine insoluble. Cette étape de consolidation permet donc de maintenir la structure de notre objet 3D mais aussi de maintenir les cellules emprisonnées dans un réseau complexe de biomatériaux.

Cependant, l'utilisation d'ions calcium pour réticuler l'alginate est une étape critique lors de la biofabrication d'un hydrogel. En effet, une concentration de calcium extracellulaire élevée, peut être responsable de dommages et de mortalités cellulaires^{442,443}. Or, la solution de consolidation utilisée initialement se compose d'une concentration en CaCl_2 de 165 mM, environ 100 fois supérieure à la concentration standard qu'une cellule doit appréhender dans son milieu extracellulaire.

Partant de ce constat, nous avons alors étudié le développement d'une nouvelle solution de consolidation réduite en concentration de calcium, non solubilisée dans de l'eau milliQ, permettant encore de maintenir une stabilité 3D de l'objet bioimprimé lors de sa mise en culture. Ainsi, nous avons utilisé le calcium directement présent dans le milieu nutritif des cellules utilisées, de concentrations comprises entre 1,4 et 1,6 mM, en fonction des milieux de culture.

La composition de notre nouvelle solution de consolidation repose alors sur un mélange de milieu de culture et d'une solution de thrombine de concentration 10 U/mL. Cette solution de consolidation, déposée sur les objets bioimprimés, permet aux cellules de se retrouver directement dans un environnement favorable à leur développement.

De plus, la solution de consolidation initiale de 165 mM de CaCl_2 solubilisée dans l'eau milliQ nécessitait un temps de consolidation minimum de 1h pour permettre à la bioencres de se consolider de manière homogène. Ce temps est d'autant plus long que l'objet bioimprimé sera de volume important. Par conséquent, les cellules présentes dans l'objet bioimprimé se retrouvaient dans un environnement défavorable pendant une longue période, ajoutée d'une étape de rinçage par du PBS permettant d'éliminer le calcium et la thrombine en excès est réalisée avant de pouvoir enfin placer les cellules dans leur milieu de culture. Avec la solution de consolidation que nous avons développé, les cellules se retrouvent alors immédiatement dans un environnement favorable.

Nous avons réalisé des coupes ultrafines d'objets contrôlés acellulaires imprimés pour caractériser la structure interne de la bioencres après consolidation avec la nouvelle solution.

Deux conditions ont été analysées :

- Alginate, gélatine et fibrinogène solubilisés dans du milieu de culture DMEM (-) : milieu de culture en absence d'ions calcium.
- Alginate, gélatine et fibrinogène solubilisés dans du milieu de culture DMEM (+) : milieu de culture en présence d'ions calcium de concentration 1,45 mM.

Les deux objets imprimés ont suivi exactement le même protocole de formulation, d'impression et de consolidation par une solution composée de milieu de culture de concentration en calcium 1,45 mM et de thrombine de concentration 10 U/mL. Les objets ont été placés à l'incubateur à 37°C pendant 24h puis fixés avec une solution de paraformaldéhyde 4%. Après inclusion, des coupes de 5 µm ont été réalisées puis colorées par l'hématoxyline et l'éosine (H&E).

La Figure 63 nous permet d'observer une différence majeure de structures internes des deux hydrogels en fonction de la nature du milieu de culture utilisé lors de la préparation des biomatériaux. Effectivement, lorsque la bioencres est préparée dans du milieu de culture sans calcium DMEM (-), l'hydrogel présente une architecture homogène et dense. Au contraire, lorsque la bioencres est préparée dans du milieu de culture avec calcium DMEM (+), une structure homogène et poreuse et homogène. Nous pouvons émettre l'hypothèse que cette porosité correspondrait à des microdomaines d'alginate de Ca^{2+} qui se seraient formés par chélation directement à l'intérieur de la bioencres solubilisée dans 1,6 mM de $CaCl_2$ due à la présence de DMEM (+). Ces microdomaines d'alginate, de la même manière que les microbulles que l'on peut retrouver dans certains hydrogels, favoriseraient l'adhésion et le développement accéléré des cellules présentes dans l'hydrogel⁴⁴⁴.

Et de manière générale, les structures poreuses étant largement privilégiées en ingénierie tissulaire, facilitant la migration et les communications cellulaires, cette formulation semble idéale pour le développement de nos tissus vasculaires²³³.

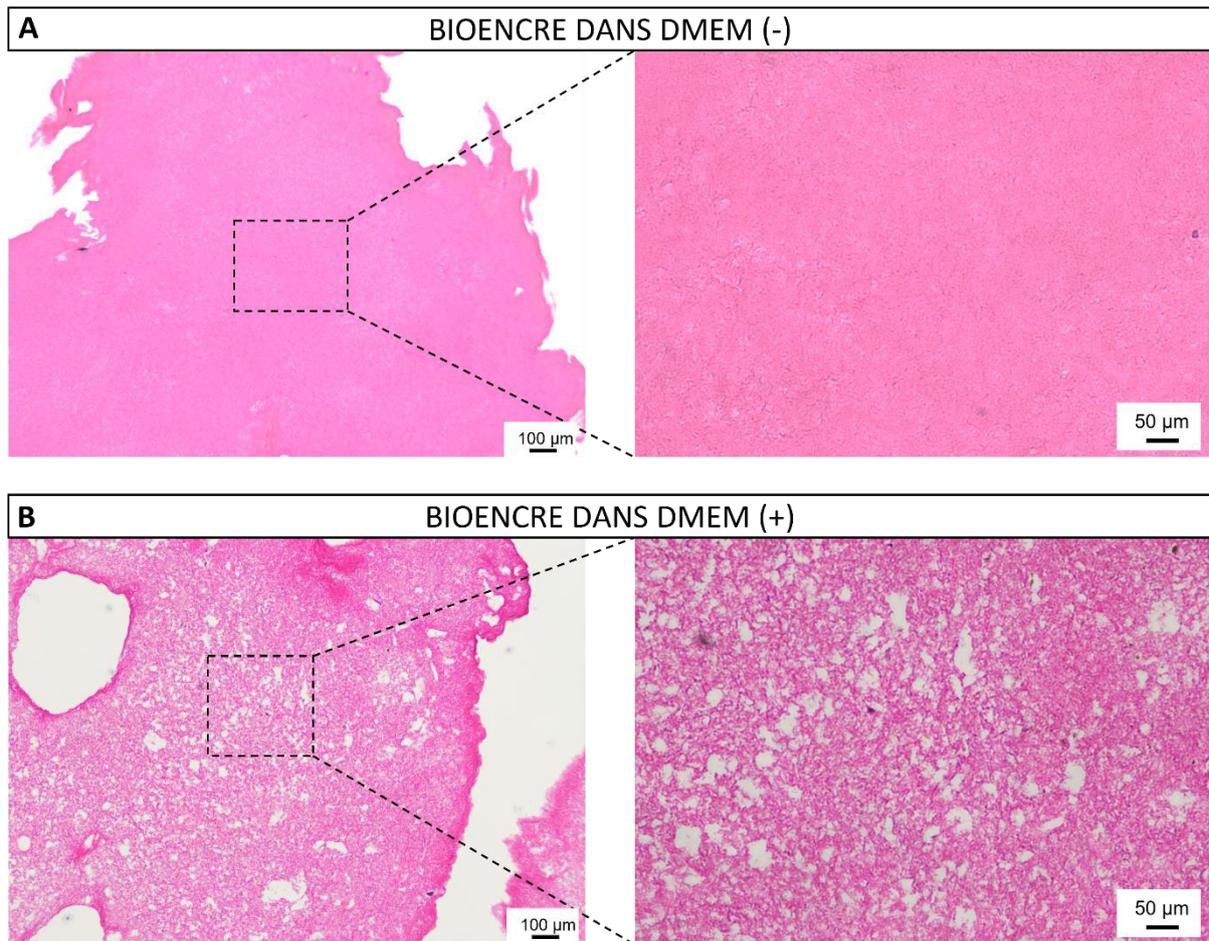


Figure 63 Caractérisations histologiques par coloration à l'hématoxyline et l'éosine de différents hydrogels bioimprimés démontrant l'architecture interne en fonction du milieu de solubilisation de la bioencres après 24h de culture. **(A)** Structure interne homogène et dense pour la bioencres préparée dans du milieu nutritif sans calcium, DMEM (-) (barres d'échelle 100 et 50 µm, coupe de 5 µm). **(B)** Structure interne homogène et poreuse pour la bioencres préparée dans du milieu nutritif avec calcium DMEM (+) (barres d'échelle 100 et 50 µm, coupe de 5 µm).

Le Tableau 11 résume les limitations que nous avons observées lors de l'utilisation de la solution de consolidation initiale et les solutions que nous avons développées grâce à la formulation d'une solution de consolidation optimale.

Tableau 11 Résumé des limitations rencontrées lors de l'utilisation de la solution de consolidation initiale et les solutions apportées.

LIMITATIONS RENCONTREES PAR LA SOLUTION DE CONSOLIDATION INITIALE	SOLUTIONS APPORTEES
Concentration en CaCl ₂ élevée : 165 mM	Concentration en CaCl ₂ répondant aux concentrations extracellulaires optimales : 1,4 – 1,6 mM
Solubilisée dans de l'eau milliQ	Utilisation exclusive de milieu de culture
Période de consolidation d'au moins 1h dans un environnement défavorable, suivi d'une étape de rinçage avant la mise en culture	Environnement favorable grâce à l'utilisation de milieu de culture dans la solution de consolidation, permettant la mise en culture instantanée

III.3. Le développement cellulaire

Pour valider notre développement d'une bioencres et d'une solution de consolidation exclusivement formulées à partir de milieu de culture, nous avons réalisé des marquages par la calcéine AM permettant d'identifier les cellules vivantes et actives.

Ces marquages, suivis d'une observation par microscopie de fluorescence et des analyses d'image, permettent de quantifier la présence de cellules vivantes et actives (Figure 64).

Des hydrogels contenant une co-culture de fibroblastes ($0,25 \cdot 10^6$ cellules/mL) et d'HUVEC ($1,0 \cdot 10^6$ cellules/mL) ont été bioimprimés. Nous avons alors pu évaluer l'impact de la solution de consolidation sur le développement cellulaire. Pour cela, trois concentrations différentes de CaCl₂, mélangées à une concentration de thrombine de 10 U/mL, ont été évaluées :

- 1,45 mM, correspondant à la concentration utilisée dans cette thèse (Figure 64 a)
- 55 mM, correspondant à une concentration intermédiaire (Figure 64 b)

- 165 mM, correspondant à la concentration utilisée pour la bioencres initiale⁴³⁶ (Figure 64 c)

Des marquages ont été réalisés à différents temps de culture allant de 1 jour post bioimpression jusqu'à 40 jours post bioimpression.

Avec l'utilisation d'une concentration de 1,45 mM de CaCl_2 dans la solution de consolidation, les cellules se développent rapidement en 7 jours, pour atteindre un maximum de développement, stable jusqu'à 40^{ème} jour de culture (Figure 64 a).

Avec l'utilisation de 55 mM de CaCl_2 dans la solution de consolidation, les cellules se développent beaucoup plus lentement, avec une phase de prolifération importante à partir du 18^{ème} jour culture, pour atteindre un maximum de prolifération au 40^{ème} jour de prolifération (Figure 64b).

Enfin, l'utilisation de 165 mM de CaCl_2 dans la solution de consolidation réduit considérablement le développement cellulaire avec un début de prolifération au 26^{ème} jour de culture, pour atteindre un maximum de prolifération au 40^{ème} jour de culture (Figure 64 c).

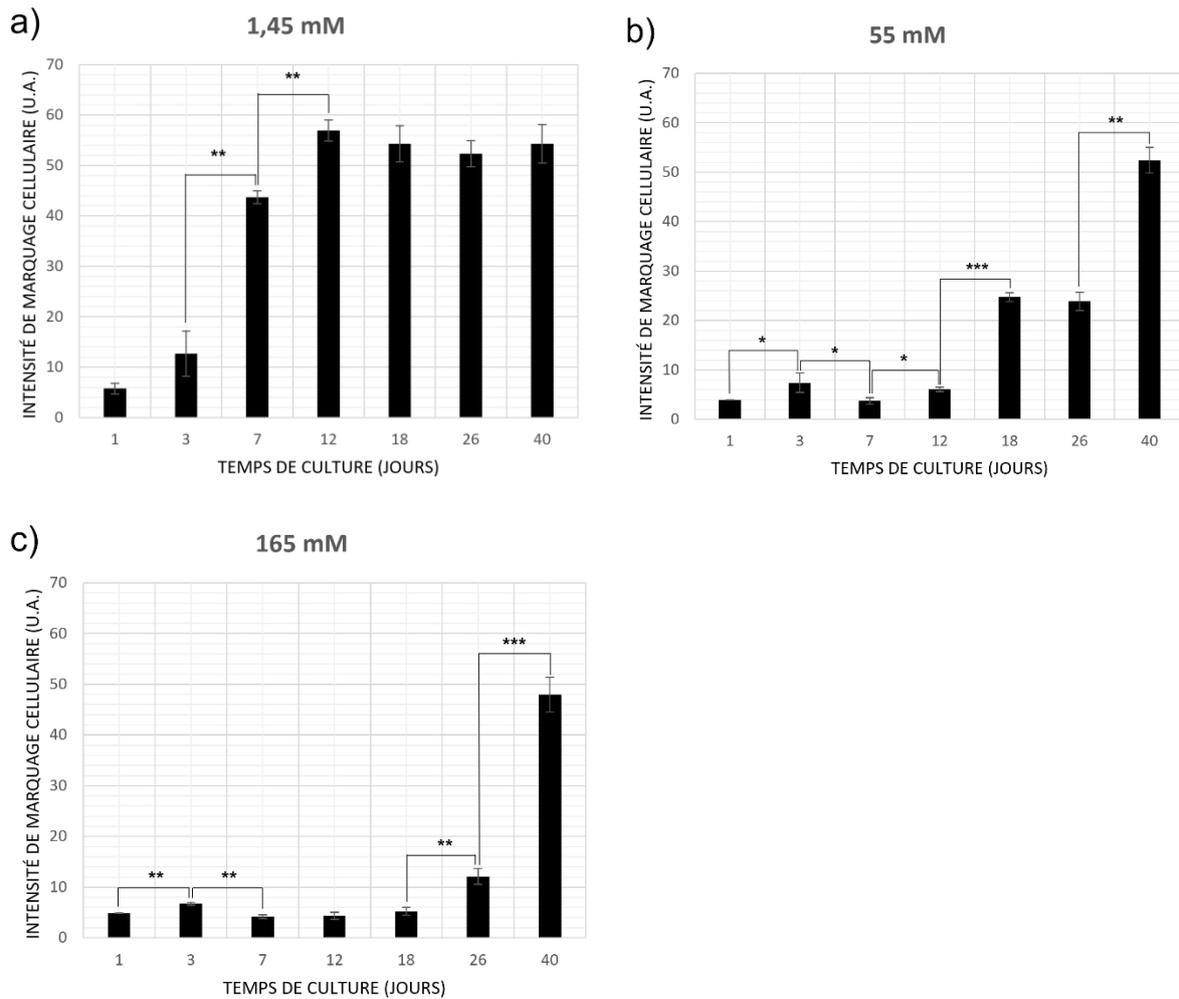


Figure 64 Graphiques représentant le développement des cellules à l'intérieur d'un hydrogel bioimprimé en fonction de la concentration de CaCl_2 contenue dans la solution de consolidation. **a)** Solution de consolidation contenant 1,45 mM de CaCl_2 , **b)** solution de consolidation contenant 55 mM de CaCl_2 et **c)** solution de consolidation contenant 165 mM de CaCl_2 . $n = 4$; valeur- p calculée selon le test t de Welch, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ et \emptyset = non significatif.

Ces résultats nous ont permis d'évaluer l'impact de la solution de consolidation sur le développement cellulaire post bioimpression, et notamment l'effet important de la concentration en calcium.

Après avoir démontré l'utilisation avantageuse d'une solution de consolidation contenant une quantité réduite en calcium, nous avons réalisé une dernière étude de développement cellulaire en fonction du milieu de culture utilisé lors de la préparation des différents biomatériaux de la bioencre. En effet le développement d'un tissu vasculaire nécessite

l'utilisation de plusieurs cellules, notamment des cellules endothéliales et des fibroblastes, dont les milieux de culture 2D diffèrent. Pour cela, quatre conditions ont été testées :

- Les biomatériaux solubilisés dans du DMEM sans calcium : DMEM (-)
- Les biomatériaux solubilisés dans du DMEM avec calcium : DMEM (+)
- Les biomatériaux solubilisés dans de l'EGM2 (milieu de culture des cellules endothéliales)
- Les biomatériaux solubilisés dans un mélange équivalent 1 :1 (DMEM/EGM2) : milieu MIX

Une fois la gélatine, l'alginate et le fibrinogène solubilisés dans les différents milieux de culture, ils sont mélangés à une co-culture de fibroblastes ($0,25 \cdot 10^6$ cellules/mL de bioencres) et d'HUVEC ($1,0 \cdot 10^6$ cellules/mL de bioencres). Un marquage par la calcéine AM des cellules vivantes a ensuite été réalisé à différents temps de culture allant de 1 à 7 jours post bioimpression (temps de développement optimal avec l'utilisation de la nouvelle solution de consolidation démontré sur la Figure 64).

La Figure 65 présente les différences d'intensité de marquage par la calcéine AM reflétant les différences de développement des cellules à l'intérieur des hydrogels bioimprimés, en fonction du milieu de solubilisation de la bioencres.

D'après les résultats présents sur le graphique, nous pouvons remarquer que la condition a) de préparation de la bioencres dans le DMEM (-) permet un développement cellulaire à l'intérieur de l'hydrogel qui se stabilise à partir du 3^{ème} jour de culture. Au contraire, dans les trois autres conditions de préparation b), c) et d), les cellules continuent de se développer à l'intérieur de l'hydrogel jusqu'à atteindre un maximum de prolifération à partir du 7^{ème} jour. Ces résultats permettent d'appuyer les précédents résultats sur l'effet positif de la présence de calcium, à une concentration comprise entre 1,45 mM (pour le milieu DMEM) et 1,6 mM (pour le milieu EGM2), directement lors de la préparation des biomatériaux. Le fait de ne pas mettre de calcium dans la bioencres (DMEM (-)) semble avoir un effet négatif sur le développement cellulaire par rapport aux autres milieux. Ces résultats sont cohérents par rapport aux résultats histologiques démontrés précédemment (Figure 63).

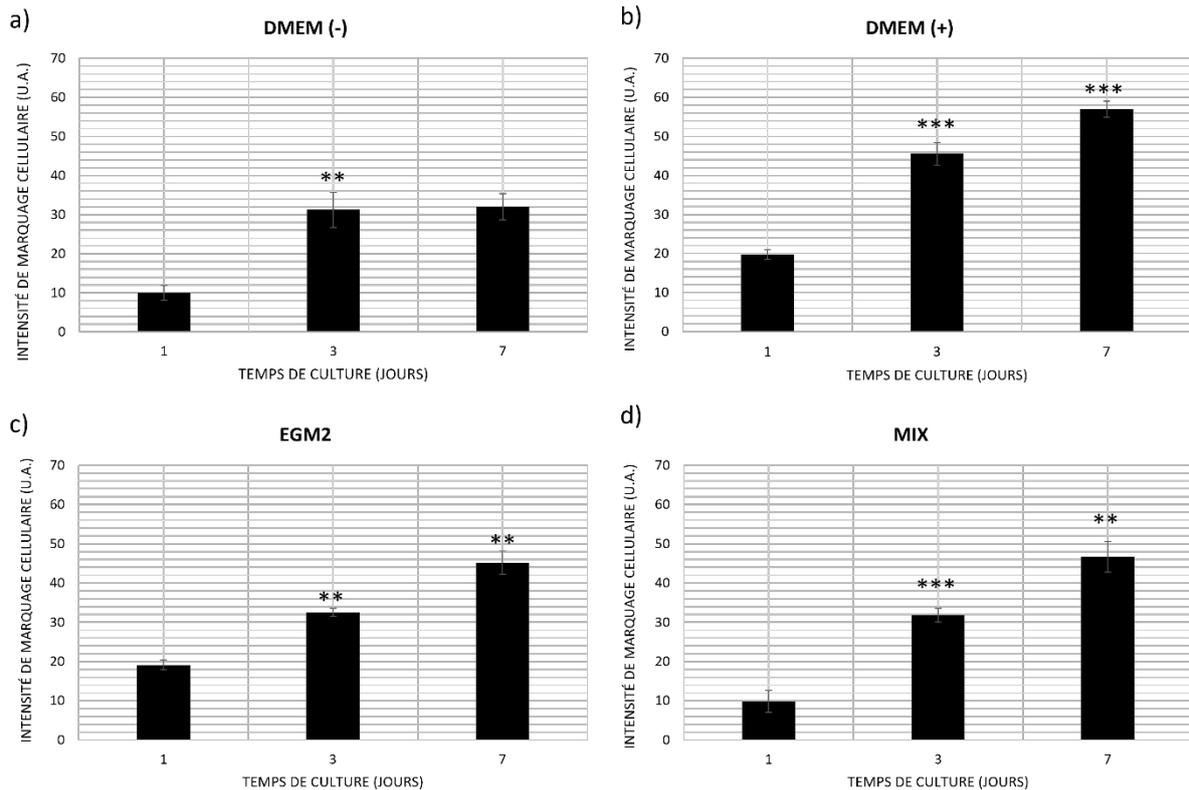


Figure 65 Graphiques représentant le développement cellulaire à l'intérieur d'un hydrogel bioimprimé en fonction du milieu de solubilisation de la bioencres. **a)** Bioencres préparée dans le milieu nutritif DMEM (-) (sans CaCl_2), **b)** bioencres préparée dans le milieu nutritif DMEM (+) (contenant 1,6 mM de CaCl_2), **c)** bioencres préparée dans le milieu nutritif EGM2 (contenant 1,6 mM de CaCl_2) et **d)** bioencres préparée dans un mélange proportionnel 1 :1 des milieux nutritifs DMEM/EGM2 (contenant 1,6 mM de CaCl_2). $n = 4$; valeur- p calculée selon le test t de Welch, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ et \emptyset = non significatif.

IV. Résumé des propriétés de la nouvelle bioencres

La bioencres et la solution de consolidation développées durant ces travaux de thèse ont démontré un impact important sur le développement cellulaire à l'intérieur de l'hydrogel bioimprimé. Effectivement, après avoir déterminé les limitations rencontrées avec l'utilisation de la bioencres initiale⁴³⁶, nous avons développé des solutions d'amélioration permettant de répondre de manière optimale au développement cellulaire à l'intérieur d'un hydrogel bioimprimé.

La Figure 66 présente les différentes étapes allant de la préparation des solutions mères de biomatériaux, jusqu'à la mise en culture de l'objet bioimprimé pour la bioencre initiale et pour la nouvelle bioencre développée au cours de ce projet de thèse. Une différence importante de temps est constatée entre les deux protocoles. En effet, une optimisation de la préparation des biomatériaux le jour même de la bioimpression ainsi que l'optimisation de l'étape de consolidation, permet de passer d'un temps de biofabrication d'environ 14h pour les temps de consolidation les plus faibles (1h), à un temps moyen d'environ 3h pour la nouvelle bioencre.

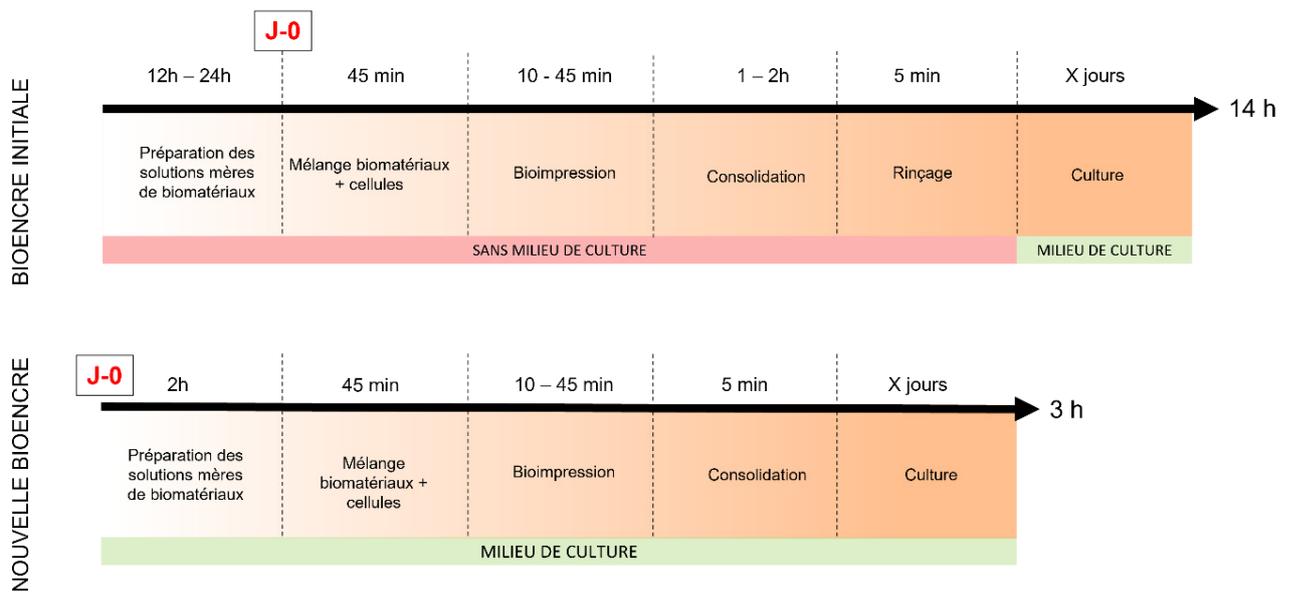


Figure 66 Echelle de temps comparative en fonction de la bioencre initiale et de la nouvelle bioencre. Etapes allant de la préparation des solutions mères des biomatériaux jusqu'à la mise en culture de l'objet bioimprimé à 37°C.

Cette bioencre et sa solution de consolidation nous permettent donc de répondre à la totalité des paramètres clés de notre cahier des charge (Figure 67).

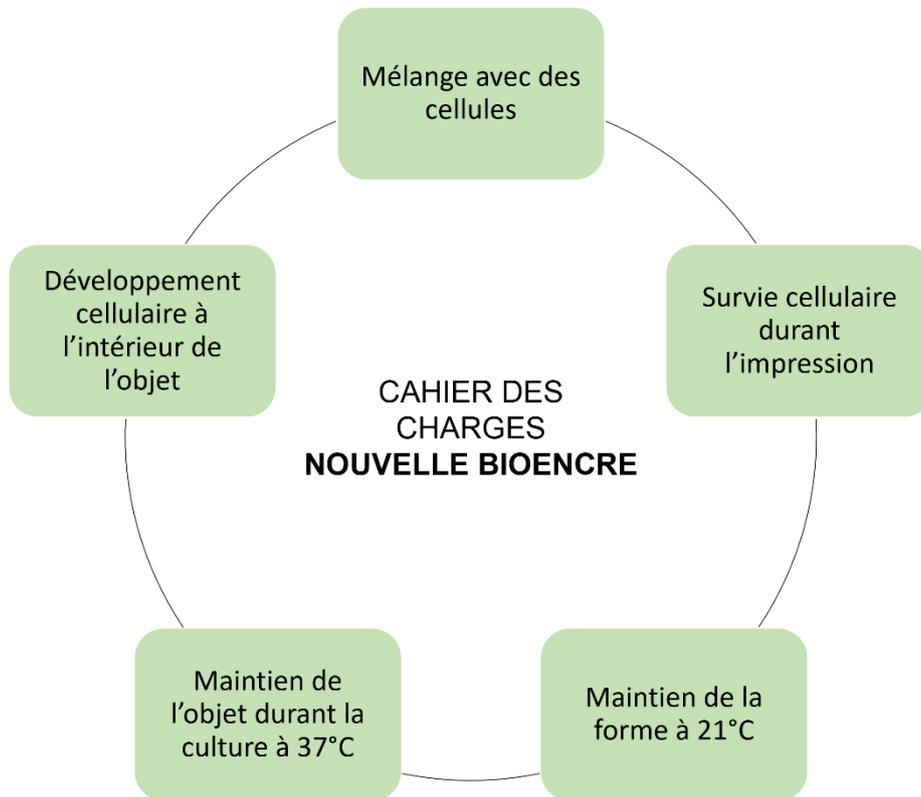


Figure 67 Paramètres clés auxquels répond (vert) la bioencres ainsi que sa solution de consolidation développée durant ces travaux de thèse.

Enfin, le Tableau 12 représente toutes les évolutions de la bioencres que nous avons développée durant ces travaux de thèse, par rapport à la bioencres développée initialement en 2018 au sein du laboratoire. Des évolutions au niveau de la préparation des biomatériaux, mais aussi lors de la bioimpression et de la consolidation sont ainsi remarquées.

Tableau 12 Description des principales évolutions de la bioencres développée durant ces travaux de thèse par rapport à la bioencres développée initialement en 2018 au sein du laboratoire.

		BIOENCRES INITIALE	BIOENCRES FINALE
PREPARATION DE LA BIOENCRES	Préparation des biomatériaux	La veille	Le jour-même
	Gélatine (<i>concentration finale</i>)	10 % (m/v)	7,5 % (m/v)
	Alginate (<i>concentration finale</i>)	1 % (m/v)	0,5 % (m/v)
	Fibrinogène (<i>concentration finale</i>)	2 % (m/v)	2 % (m/v)
	Solution de solubilisation	NaCl 0,9 % (m/v) dans eau milliQ	Milieu de culture PSF 1X et [CaCl ₂] = 1,6 mM
BIOIMPRESSION	Température de bioimpression	28°C	21°C
	Composition (<i>concentration finale</i>)	[CaCl ₂] = 165 mM [Thrombine] 20 U/mL	[CaCl ₂] = 1,45-1,6 mM Thrombine 10 U/mL
CONSOLIDATION	Solution de solubilisation	Eau milliQ	Milieu de culture avec [CaCl ₂] = 1,6 mM
	Temps de consolidation	Minimum 1h	/
	Température de consolidation	Minimum 1h à 21°C	5 min à 21°C puis passage à 37°C pour toute la maturation
	Rinçage	Solution de PBS	Pas d'élimination de la solution

V. Conclusions

Dans ce chapitre nous avons étudié les différentes étapes majeures de développement et d'optimisation d'une bioencres permettant une prolifération cellulaire dans un hydrogel 3D en 7 jours, que nous avons utilisé durant ces travaux de thèse pour la bioimpression des tissus vasculaires et vascularisés.

Les études expérimentales que nous avons menées par l'utilisation d'un polymère de collagène de méduse, pourraient permettre dans le futur de s'affranchir de l'utilisation de collagène humain grâce à sa disponibilité plus exploitable et permettre des avancées majeures dans le domaine de l'ingénierie tissulaire. Cependant à l'heure actuelle, l'utilisation de ce type de collagène reste à améliorer pour des applications de bioimpression 3D notamment puisque la formulation d'une bioencres reste un processus complexe.

L'utilisation d'une bioencres à base de collagène humain nous a permis d'évaluer la complexité technique d'élaborer une bioencres à partir de microparticules, ce qui nous a orienté vers une technique innovante de bioimpression 3D : la technique de bioimpression coaxiale.

Grâce à ces différentes études de formulations et à l'aide des travaux réalisés précédemment au sein de notre laboratoire sur le développement d'une bioencres pour la bioimpression de tissus vivants, nous avons développé et optimisé une formation de bioencres imprimable à température ambiante (21°C). Cette nouvelle bioencres permet aux cellules d'adhérer, de proliférer et de mûrir à l'intérieur de l'hydrogel bioimprimé en un temps réduit de 7 jours. La bioencres a été caractérisée par rhéologie afin de déterminer si cette nouvelle formulation correspondait aux critères d'imprimabilité avec notamment un comportement rhéofluidifiant permettant de réduire la contrainte de cisaillement subit par les cellules durant le processus de bioimpression. Enfin, des coupes histologiques ont apporté une visualisation de la structure poreuse de notre bioencres parfaitement compatible avec la colonisation cellulaire.

CHAPITRE IV : TECHNIQUES DE BIOFABRICATION POUR LE TISSU VASCULAIRE

Dans ce chapitre nous allons présenter les différentes techniques de biofabrication que nous avons mises en place pour l'ingénierie vasculaire. Deux approches aux objectifs distincts seront abordées : (i) la biofabrication tubulaire, avec l'utilisation d'outils permettant de répondre à un besoin de fabrication d'un objet tubulaire, multicouches, de taille centimétrique et (ii) la biofabrication plane, répondant à un cahier des charge différent axé sur le développement plus spécifique des trois couches vasculaires mimant la paroi vasculaire, formées respectivement de cellules endothéliales, de cellules musculaires lisses vasculaires et de fibroblastes.

I. Contexte et objectifs

Bien que de nombreuses techniques d'ingénierie tissulaire aient déjà conduit au développement de structures tubulaires se rapprochant de celle d'un vaisseau sanguin natif, ces procédés sont généralement chronophages et nécessitent de nombreuses étapes de fabrication séquentielles, pour répondre à l'enjeu de création d'une structure multicouche. De plus, la recherche actuelle en bioimpression est largement focalisée sur l'utilisation de méthode *top-down* avec des encres fugitives qui permettent une impression aisée d'un objet dense et compact, au sein duquel les vaisseaux sanguins sont ensuite formés par lavage/dissolution de l'encre fugitive. Ces techniques permettent finalement d'obtenir des structures de complexité réduite ne s'adaptant pas à une maturation ou un remodelage du tissu.

Pour répondre aux besoins de l'ingénierie tissulaire, les exigences de biofabrication se concentrent alors sur l'inclusion de plusieurs types cellulaires ainsi que de plusieurs biomatériaux différents, avec des dimensions centimétriques (ordre de grandeur d'un organe complet), tout en prenant en compte la logistique de maturation post-impression.

Dans ce chapitre nous allons présenter les différentes techniques de biofabrication que nous avons mises en place pour l'ingénierie vasculaire. Chacune des deux approches répondent à un cahier des charges spécifique que nous décrivons. En effet, les paramètres de création d'une structure 3D tubulaire et multicouche ne sont pas les mêmes que ceux pour la création d'une structure plane et multicouches. La bioimpression 3D offre ici des voies de recherche innovantes pour l'ingénierie tissulaire. Cependant, les besoins pour construire un tissu vasculaire multicellulaire, multicouche, tubulaire et de taille centimétrique, ajoutent de la complexité aux techniques de bioimpression classiques, qui doivent être ainsi améliorées pour répondre à cette demande. Nous décrivons neuf techniques de bioimpression 3D utilisées au cours de ces travaux de recherche et possédant chacune leurs avantages et inconvénients.

Elles présentent la contrainte d'utiliser des logiciels propriétaires peu flexibles (*Tableau 13*) et limités pour la fabrication de tissus complexes. En effet certain logiciel propriétaire ne permettent pas, par exemple, de déterminer l'architecture de remplissage de l'objet à imprimer (ex : concentrique, rectiligne, nid d'abeille) ce qui peut avoir des limitations pour des constructions dont la porosité à l'intérieur de l'objet est nécessaire.

Tableau 13 Liste des différentes machines de bioimpression 3D en 2021.

BIOIMPRIMANTE 3D	LOGICIELS	NOMBRE D'EXTRUDEURS	PRIX
Advanced Solutions - BioAssemblyBot®	Propriétaire	8	120 000 €
3D Systems - Allevi 3™	Propriétaire	3	45 000 €
Brinter 3D bioprinter™	Propriétaire	4	30 000 €
CELLINK - BIO X™	Propriétaire	3	45 000 €
EnvisionTec - 3D Bioplotter Developer Series™	Propriétaire	3	120 000 €
GeSIM – BioScaffolder™	Propriétaire	4	200 000 €
Regemat 3D - Reg4life™	Propriétaire	3	30 000 €
RegenHU - 3DDiscovery Evolution™	Propriétaire	6	250 000 €
Rokit healthcare - Dr. INVIVO 4D™	Propriétaire	2	25 000 €

II.2. Développement d'une bioimprimante 3D adaptée

Aux vues des limitations constatées chez les bioimprimantes commerciales actuelles, notre choix s'est porté sur l'utilisation d'une imprimante 3D T2, commercialisée par TOBECA®. Initialement utilisée pour de l'impression de filament fondu en thermoplastique, l'extrudeur a été retiré pour être remplacé par un support conçu en impression 3D, permettant de maintenir des seringues de bioimpression de capacités variables, de 3 à 55 mL. Ce système modulable nous permet de personnaliser cette imprimante selon nos besoins. De plus, la taille de la bioimprimante lui confère la capacité d'être placée sous un PSM, permettant un travail en zone totalement stérile sans risque de contaminations extérieures.

Cette imprimante 3D modifiée était dans un premier temps équipée d'un système mécanique de pousse seringue, permettant d'extruder la bioencres contenue dans la seringue *via* un système de vis sans fin, développé au sein du laboratoire⁴³⁴ (Figure 69). Cependant, des limitations sont rapidement apparues. L'extrusion de la bioencres par poussée mécanique, définie par le pas de la vis fixe (pas/mm), rend la bioimpression hétérogène en fonction du temps d'impression, de la hauteur de l'objet ou encore de quelconques variations thermiques. Le déplacement mécanique imposé permet d'influencer le débit de sortie de la seringue mais il ne permet pas de contrôler la pression exercée sur la bioencres à l'intérieur de la seringue. Le déplacement mécanique permet finalement de mesurer une quantité de bioencres extrudée par unité de temps mais ne permet pas de rétractation rapide de l'extrusion, notamment à cause des pertes de charge dans la filière.

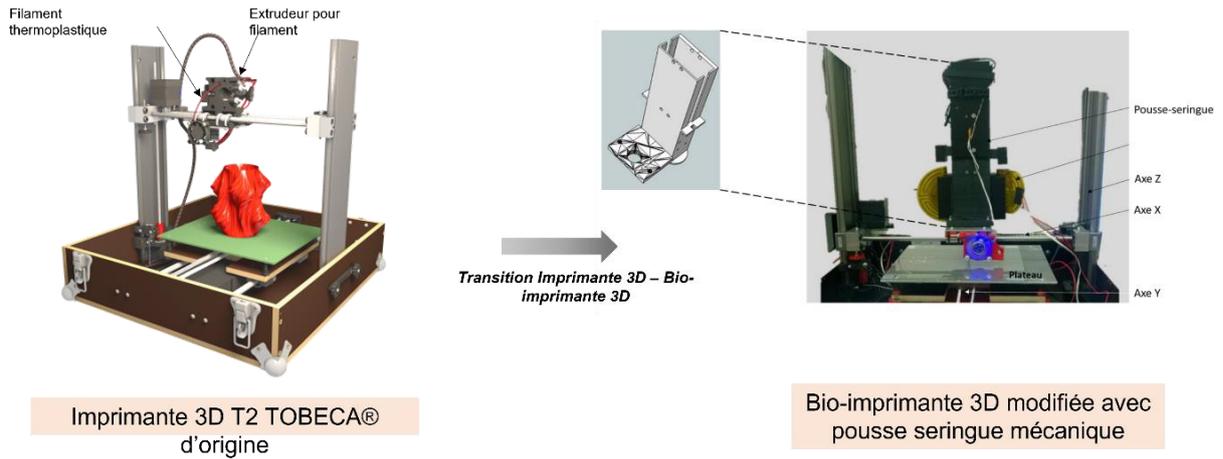


Figure 69 Photo de la modification de l'imprimante T2 pour thermoplastique (gauche) en bioimprimante 3D pour tissus vivants, grâce à l'utilisation de pression mécanique par pousse-seringue (droite).

Nous avons donc décidé de modifier ce système d'extrusion par pression mécanique en un système d'extrusion par pression pneumatique afin d'obtenir un réglage plus fin de l'extrusion (arrêt, déplacement) (Figure 70). En fonction des techniques de biofabrications utilisées pour la conception d'un tissu vasculaire, que nous détaillerons plus tard dans ce chapitre, nous avons fait évoluer ce système de pression pneumatique.

Lors de l'utilisation d'une seule seringue d'impression, un contrôleur pneumatique ValveMate™ de chez Nordson EFD a d'abord été utilisé. Celui-ci fonctionne indépendamment de la bioimprimante et possède une seule sortie d'air. Le schéma de montage comprend de façon simplifiée : (i) la seringue d'impression de chez Nordson EFD, soutenue par son support personnalisé sur l'axe X de la bioimprimante et reliée au contrôleur ValveMate™ ; (ii) le contrôleur ValveMate™ permettant de régler la pression à appliquer sur la seringue ; (iii) le contrôleur est connecté au système d'air comprimé du laboratoire P2 ; et enfin (iv) une pédale reliée au contrôleur permettant d'activer la pression pneumatique à appliquer sur la seringue.

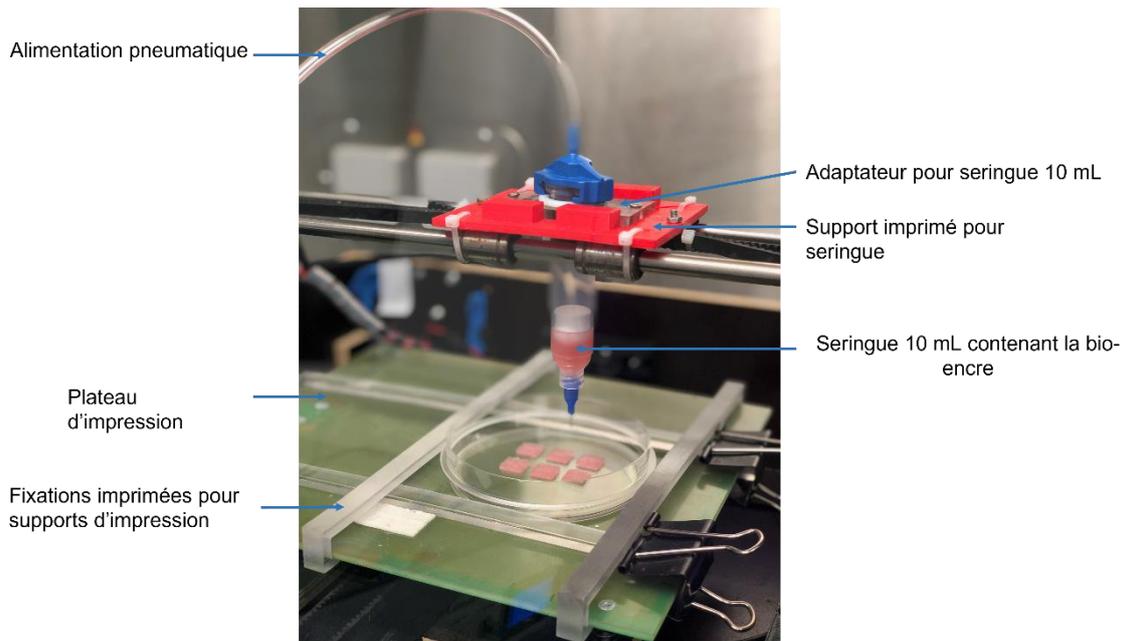


Figure 70 Photo de la bioimprimante modifiée pour un système de pression pneumatique grâce à l'impression en 3D d'un support en thermoplastique qui se fixe sur l'axe X de l'imprimante, pour accueillir des seringues d'impression.

Cependant, le besoin d'utiliser plusieurs seringues au cours d'une même bioimpression devint très vite essentiel lors de notre projet. Nous avons dans un premier temps utilisé la sortie unique du contrôleur pneumatique ValveMate™ et subdiviser celle-ci en deux. Cela permet d'appliquer la même pression sur deux seringues, en même temps. Cependant, une pression précise doit être appliquée sur sa chaque seringue, même si elles contiennent une composition de bioencre similaire.

C'est pourquoi, un système de pression pneumatique à triple sorties indépendantes, le Nucleus, a été développé en collaboration avec la société TOBECA®, nous permettant ainsi d'utiliser trois seringues d'impression différentes (Figure 71). De manière simplifiée, le schéma de montage comprend : (i) trois seringues d'impression de chez Nordson EFD, positionnées dans le support sur l'axe X, et reliées directement au contrôleur de pression pneumatique ; (ii) le contrôleur de pression pneumatique TOBECA® permettant l'ajustement précis des trois pressions indépendamment ; (iii) le contrôleur est connecté à la fois à l'ordinateur et à la bioimprimante ; enfin (iv) le contrôleur est relié directement au réseau d'air comprimé du laboratoire P2. En plus de pouvoir utiliser trois pressions différentes sur trois seringues d'impression lors de la même bioimpression, l'avantage réside aussi dans la connexion du

contrôleur à la bioimprimante, permettant d'associer le déclenchement des pressions sur chaque seringue, avec le Gcode d'impression.

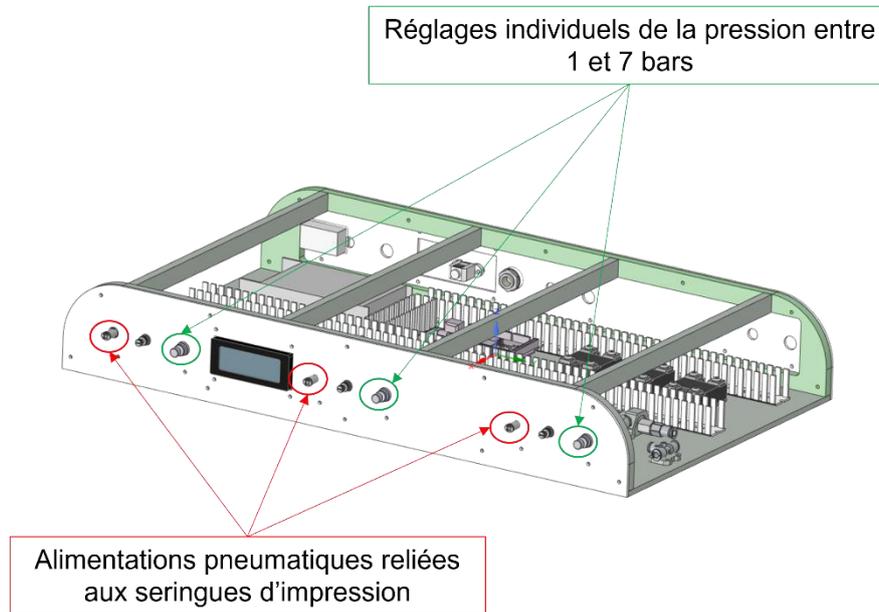


Figure 71 Schéma du système pneumatique Nucleus triple (TOBECA®) à trois sorties indépendantes.

Grâce à l'évolution de cette bioimprimante 3D répondant à nos besoins d'ingénierie de plus en plus en complexe et en particulier grâce à l'amélioration du système pneumatique, nous avons pu développer plusieurs stratégies de bioimpression 3D pour recréer un tissu vasculaire complexe.

III. Les différentes stratégies de bioimpression 3D

L'un de nos premiers défis durant ces travaux de thèse a été de réussir à recréer trois couches vasculaires de compositions cellulaires différentes, tout en réussissant à la fois à former une structure tubulaire d'échelle centimétrique et au cours d'un procédé réalisable en une seule étape. A l'heure actuelle aucune méthode ne permet de répondre à cet enjeu, c'est pourquoi nous avons développé plusieurs stratégies de bioimpression, répondant chacune à des paramètres spécifiques, nous permettant de nous rapprocher le plus possible de la technique idéale. En particulier, nous avons utilisé la bioimpression par microextrusion à un extrudeur, la bioimpression dans un gel de microparticules de gélatine, la bioimpression

coaxiale et triaxiale, la bioimpression 4D, la bioimpression par microextrusion à trois extrudeurs et enfin la biofabrication par enroulement.

III.1. La biofabrication tubulaire

III.1.1. Le cahier des charges

L'approche de biofabrication d'une structure tubulaire nécessite de respecter un cahier des charges complexe présenté dans la Figure 72 . Nous allons présenter les différentes techniques que nous avons étudiées, permettant de répondre à ces différents paramètres.

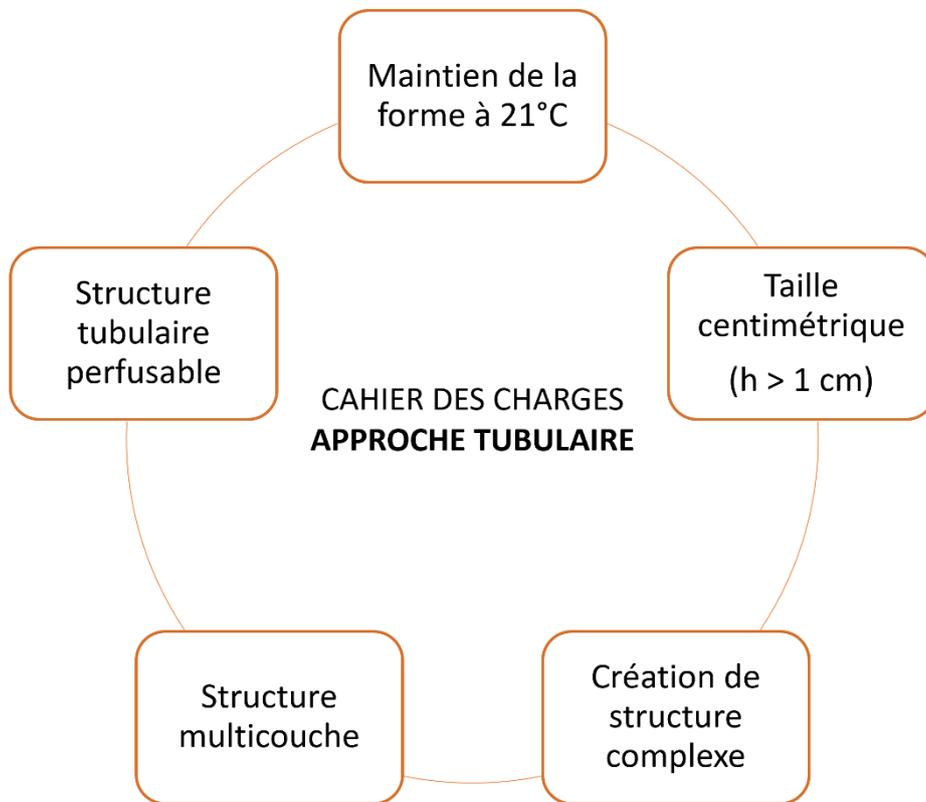


Figure 72 Cahier des charges présentant les différents paramètres clés permettant la biofabrication d'une structure vasculaire par tubulaire tricouche.

III.1.2. La bioimpression par microextrusion à 1 extrudeur

i. Etude de faisabilité

Cette technique est la technique standard utilisée en bioimpression. Elle utilise une seringue d'impression pour biofabriquer des structures composées d'une seule bioencore.

Lors de cette étude, nous avons utilisé la configuration « standard » de notre bioimprimante 3D, c'est-à-dire composée de son support unique fixé sur l'axe X, et pouvant accueillir une seringue d'impression de capacité 10 mL (Figure 73). La bioencre, que nous avons développée et décrite durant le chapitre III, a été utilisée.

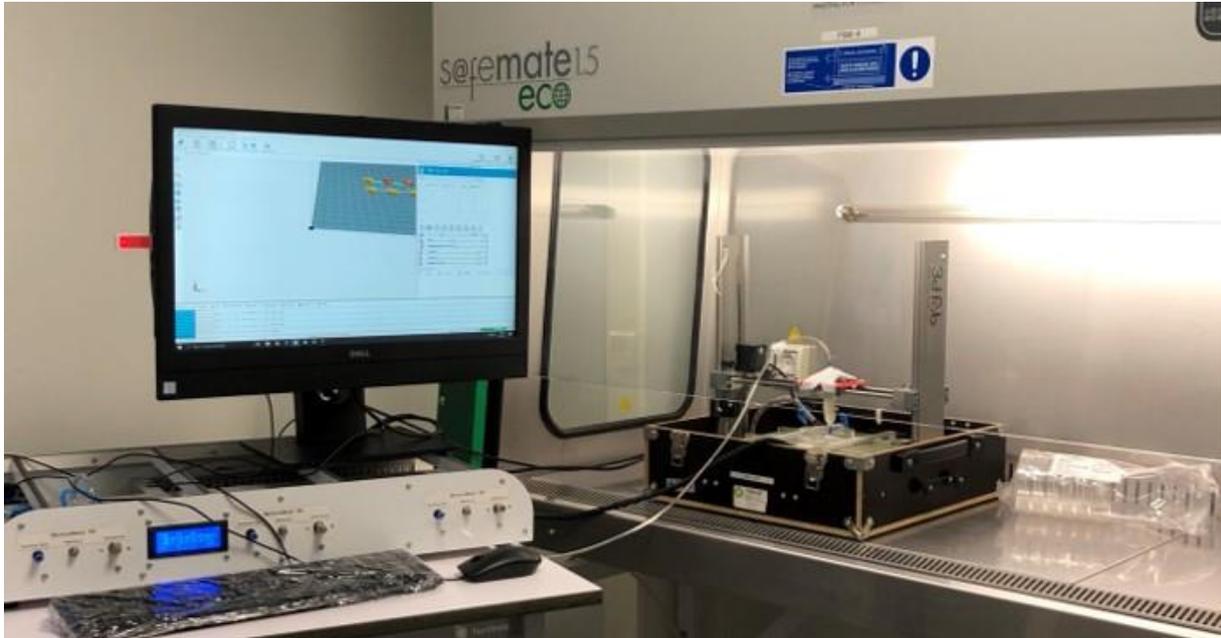


Figure 73 Configuration standard de notre bioimprimante 3D par microextrusion pneumatique. Un ordinateur et un système pneumatique sont reliés à la bioimprimante placée sous le PSM, en zone stérile.

La bioimpression d'une structure tubulaire suivant l'axe Z, donc à la verticale, est un procédé complexe car plus l'objet 3D aura une hauteur importante, plus il sera déstabilisé lors du passage de l'aiguille d'extrusion, ce qui engendre des effondrements ou des pertes de fidélité de la technique. En utilisant la technologie de bioimpression par microextrusion à un extrudeur, nous avons effectivement rencontré des limitations dans la création de structures tubulaires ne pouvant dépasser 1,5 cm de hauteur avec une seule couche vasculaire d'épaisseur 0,4 mm (Figure 74).

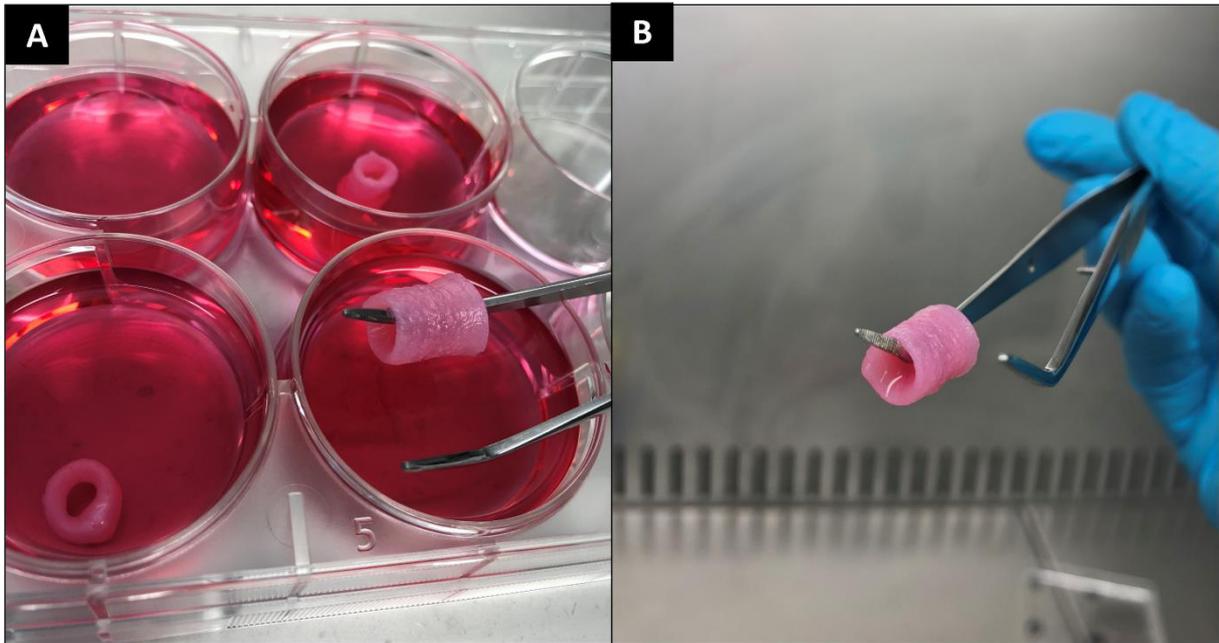


Figure 74 Image représentant des structures tubulaires bioimprimées grâce à la technologie de bioextrusion. (A) Culture de plusieurs tubes avec une hauteur maximale de 1,5 cm. Tous les tubes n'ont pas exactement la même architecture due à une limitation de maintien de la forme durant l'impression. (B) Image d'un seul tube en bioencres composé d'une seule paroi.

ii. Limites et solutions

Le Tableau 14 résume les limitations que nous avons rencontrés ainsi que les solutions à apporter pour répondre à notre cahier des charges de formation d'une structure tubulaire complexe.

Tableau 14 Résumé des limitations rencontrées lors de la bioimpression par microextrusion standard à 1 extrudeur ainsi que les solutions à apporter lors des développements futurs.

LIMITATIONS RENCONTREES	SOLUTIONS A APPORTER
Fabrication d'une seule couche à cause de l'utilisation d'une seule bioencres	Ajout d'extrudeurs pour utiliser plusieurs bioencres en même temps
Faible tenue mécanique de l'objet 3D	Utilisation d'un support durant la bioimpression
Difficulté de créer un objet de taille centimétrique pertinente	Utilisation d'un support durant la bioimpression

Les paramètres clés du cahier des charge auxquels répond l'approche de bioimpression par microextrusion à 1 extrudeur, sont identifiés dans la Figure 75.

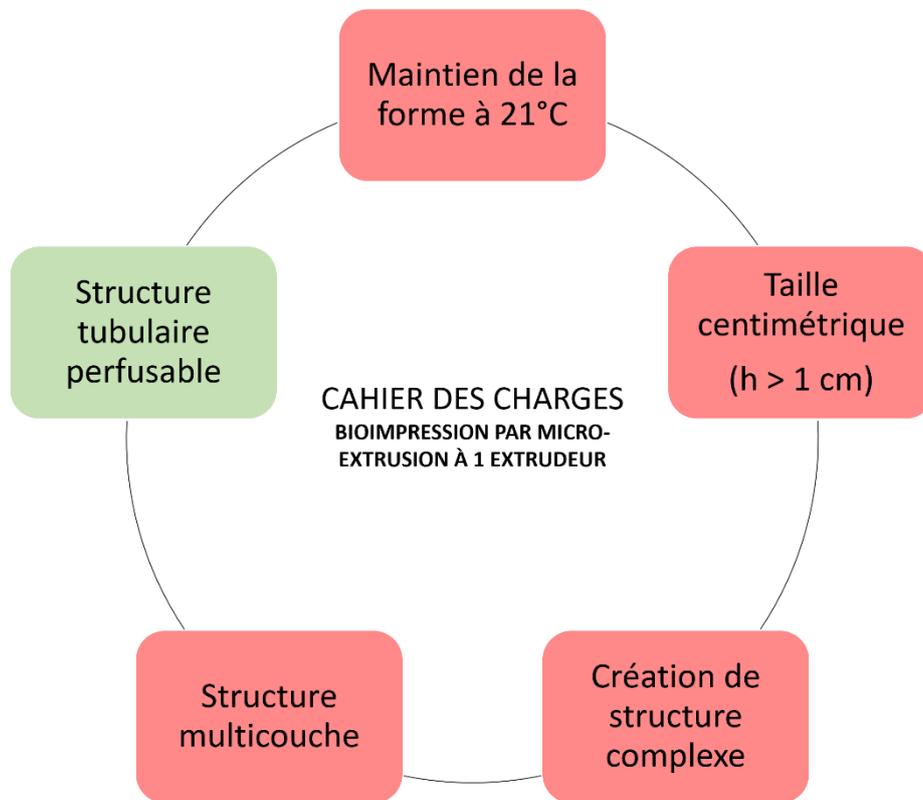


Figure 75 Paramètres du cahier des charges auxquels répond (vert) et ne répond pas (rouge) la bioimpression par microextrusion à 1 extrudeur

Cette méthode simple à mettre en œuvre, n'est cependant pas idéale pour reproduire une structure tubulaire complexe. Nous avons donc évalué une seconde méthode nous permettant de créer des morphologies d'objets complexes, à façon : l'impression 4D.

III.1.3. L'impression 4D

L'impression 4D a été introduite en 2013 comme l'ajout de la dimension du temps aux trois premières dimensions, et décrit les matériaux qui peuvent être construits par impression 3D et qui réagissent post-impression en changeant de forme, en réponse à un stimulus externe tel que la chaleur ou l'humidité³¹⁰. Au sein du laboratoire, cette définition, limitée aux objets 3D évoluant géométriquement en fonction du temps et de l'environnement, a été étendue

à l'évolution d'un objet 3D sous l'influence de paramètres physiques, chimiques, biologiques ou encore biochimiques^{312,446}.

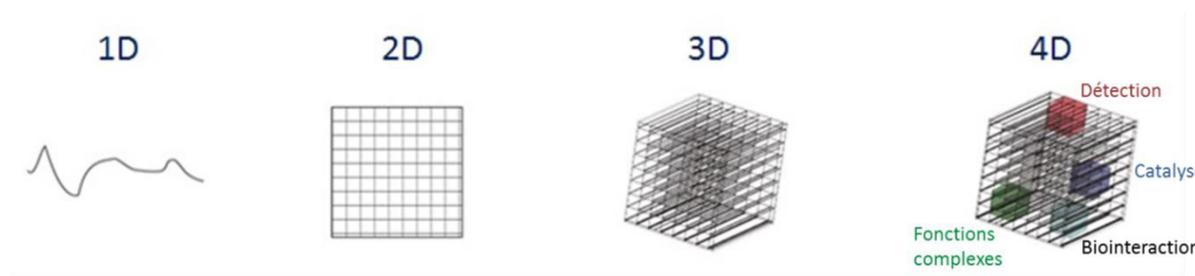


Figure 76 Concept de la 1D à la 4D. L'impression 4D définit la conception d'un objet 3D auquel de nouvelles fonctionnalités physiques, chimiques, biologiques ou biochimiques sont ajoutées⁴⁴⁷.

Cette nouvelle définition va nous permettre d'imprimer un objet 3D renfermant des biomolécules actives, telles que des enzymes, de manière organisée, à un endroit spécifique de l'objet, permettant d'enclencher une réaction enzymatique post-impression : phénomène 4D. Grâce à cette technologie nous allons présenter le développement d'une hydrogel tubulaire 3D renfermant une biomolécule active, permettant de déclencher la création d'une structure vasculaire de haute résolution, par diffusion enzymatique.

i. Etude de faisabilité

Pour cette approche, un système d'impression 3D différent de la microextrusion à 1 extrudeur, sera présenté. Une imprimante 3D utilisant la technologie de stéréolithographie 3D par traitement numérique de la lumière (*Digital Light Processing*) a été utilisée (Figure 77A). Cette technologie permet de projeter la structure de l'objet 3D à imprimer *via* un vidéoprojecteur. La lumière visible émise par celui-ci, représentant la structure à imprimer, va permettre la polymérisation d'une encre liquide, contenue dans une cuve d'impression (Figure 77B). Ici, une encre spécifiquement développée au laboratoire³¹², formulée à partir de polyéthylène glycol diacrylate (PEG700DA) et d'un agent photoinitiateur, l'Irgacure 819, est utilisé.

Dans cette étude, nous avons voulu créer un objet tubulaire jouant le rôle de structure intermédiaire au développement, sous l'action d'une enzyme, d'une nouvelle structure tubulaire cellularisée. En effet, il n'est pas possible d'utiliser de cellules lors de cette étape d'impression par photopolymérisation car l'utilisation du photoinitiateur n'est pas/peu

biocompatible. De la thrombine a été ajoutée à l'encre initialement développée puis déposée dans la cuve d'impression de l'imprimante 3D. Grâce à la technologie de photopolymérisation sous l'action de la lumière visible, la thrombine va se retrouver piégée à l'intérieur de l'objet 3D en cours d'impression. A la fin de cette impression, un objet 3D de morphologie tubulaire et renfermant la biomolécule active de thrombine sera créé (Figure 77C).

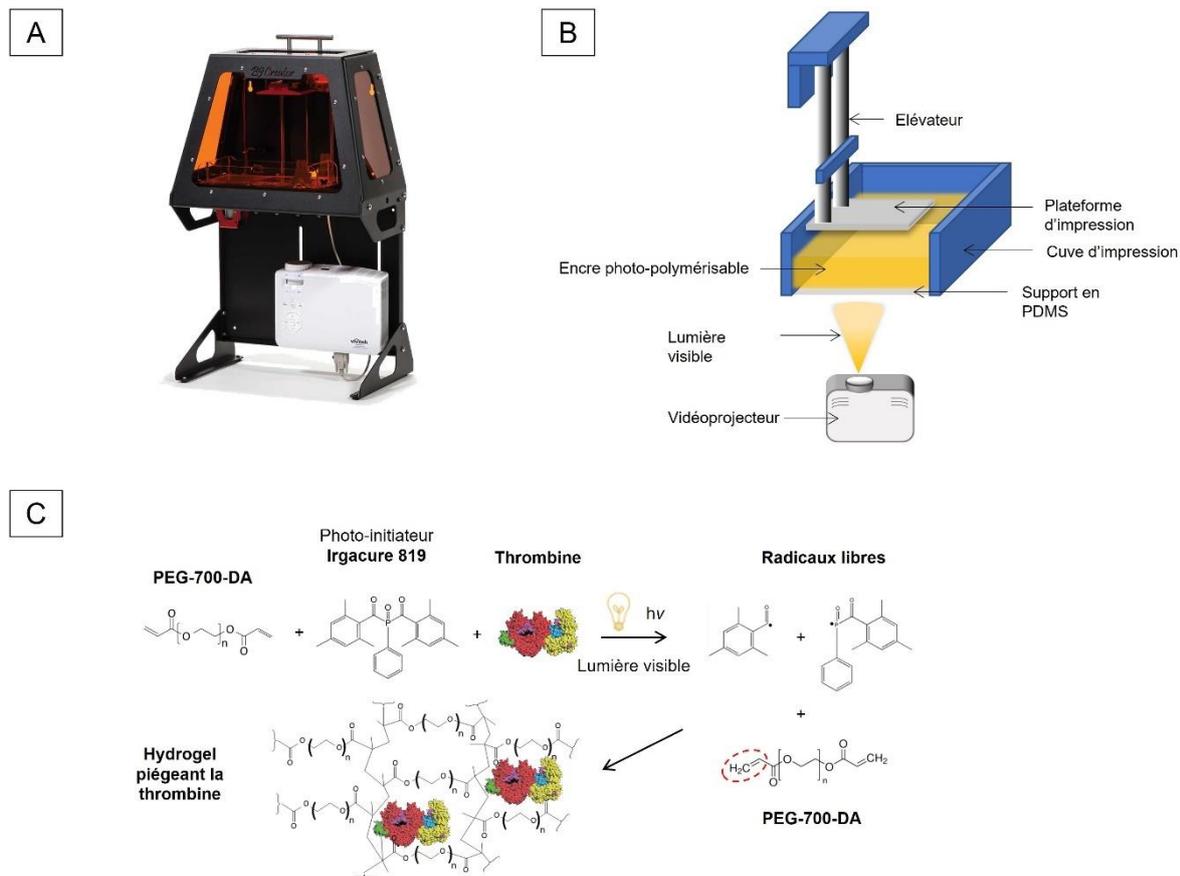


Figure 77 Impression 4D par traitement numérique de la lumière (DLP). **(A)** Photo de l'imprimante 3D B9 Creator utilisée. **(B)** Schéma du principe de fonctionnement de l'impression 3D par DLP. **(C)** Réaction de polymérisation de l'encre composée de PEG700DA, de l'Irgacure 819 et de la thrombine, sous l'action de la lumière visible, permettant de piéger la molécule de thrombine dans les pores du PEG700DA.

L'objet ainsi créé va jouer le rôle de précurseur à la création de notre structure tubulaire cellularisée. Pour cela, une fois l'objet de PEG700DA imprimé, il est rincé pour éliminer les résidus de photoinitiateur, toxique pour les cellules. Une solution de fibrinogène (F) contenant

des cellules NIH eGFP est ensuite déposée à l'intérieur de l'hydrogel tubulaire de PEG700DA (Figure 78A). Une réaction enzymatique de polymérisation du fibrinogène en fibrine, est alors déclenchée sous l'action de la thrombine présente dans l'hydrogel de PEG700DA. Les molécules de thrombine vont diffuser de l'hydrogel de PEG700DA jusqu'aux molécules de fibrinogènes présentes au centre du cylindre. Un réseau de fibrine insoluble (f) est alors créé sur toute la surface interne du cylindre de PEG700DA (Figure 78B).

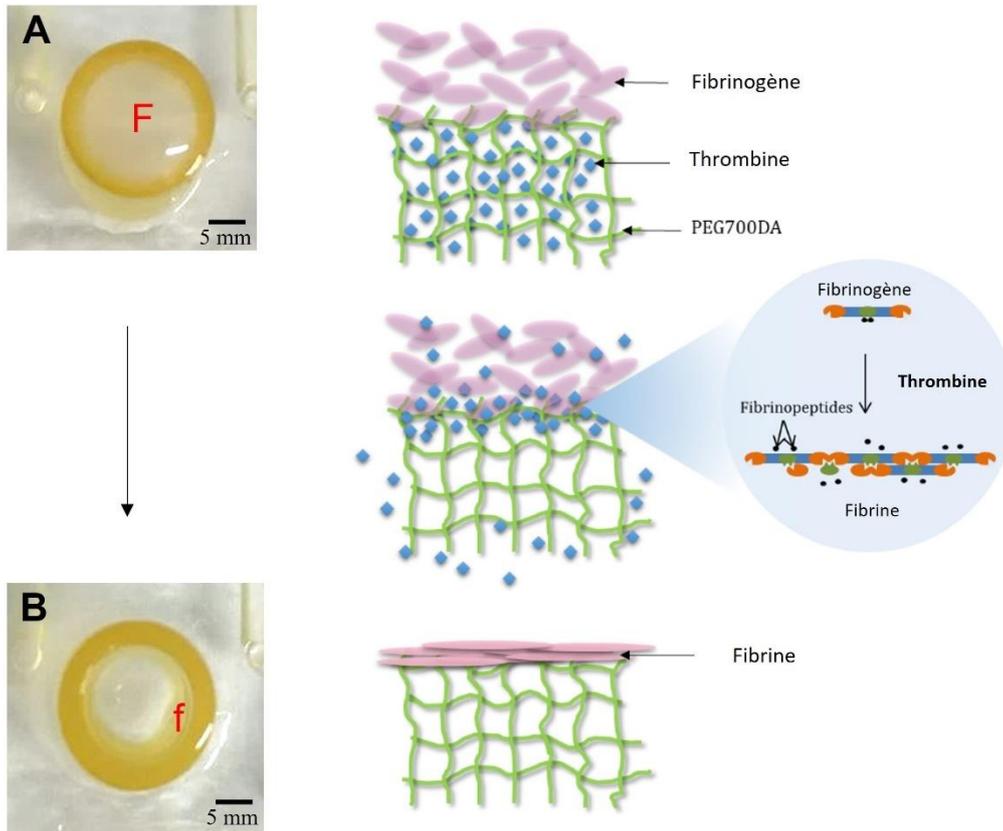


Figure 78 Représentation du processus d'impression 4D d'une structure vasculaire par diffusion enzymatique. (A) Dépôt d'une solution de fibrinogène (F) contenant des cellules, à l'intérieur de l'hydrogel tubulaire de PEG700DA renfermant la thrombine. Une réaction enzymatique est déclenchée sous l'action des molécules de thrombine diffusant jusqu'aux molécules de fibrinogène au centre du cylindre. La thrombine, clive les fibrinopeptides pour former un réseau de fibrine (f) insoluble sur toute la périphérie centrale du cylindre de PEG700DA.

Afin de quantifier la libération de thrombine, de poids moléculaire de 34 kDa, piégée à l'intérieur des pores de l'hydrogel de PEG700DA, et permettre l'auto-assemblage du fibrinogène à l'intérieur de cet hydrogel, nous avons réalisé un suivi de cette libération au cours du temps.

L'hydrogel renfermant la thrombine a donc été placé dans un bain de PBS et des prélèvements effectués toutes les 10 minutes. Chaque échantillon est ensuite mélangé à un substrat chromogénique de la thrombine. Ce substrat est un peptide synthétique hydrolysé par la thrombine, libérant alors un chromophore qui peut être suivi par spectrophotométrie (405 nm). Cette étape nous permet de déterminer l'activité de la thrombine libérée à partir des pores de l'hydrogel de PEG700DA.

Les résultats présentés sur la Figure 79A démontrent que cette libération prend place seulement durant les 60 premières minutes et qu'une activité totale de 0,7 unité a été libérée. Cette activité doit être comparée aux 35 unités initiales présentes dans l'hydrogel de PEG700DA. Ainsi, 2 % de la teneur initiale en thrombine ont été libérés au cours de la première heure, suffisamment pour générer une activité locale à la surface de l'hydrogel et pour déclencher la formation de fibrine.

La formation d'un film de fibrine à la surface de l'hydrogel de thrombine 4D a été démontré comme le montre la Figure 79B. En effet, après 1h d'incubation de la solution de fibrinogène cellularisée de concentration 2 % (m/v) à l'intérieur de l'hydrogel de PEG700DA, une structure tubulaire de fibrine de 100 μm d'épaisseur a été obtenue (Figure 79B).

Enfin, d'après la Figure 79C, une population dense de cellules NIH eGFP a été obtenues dans le gel de fibrine développé en 4D. Les cellules sont donc piégées à l'intérieur du réseau de fibrine développée sous l'action de la thrombine libérée.

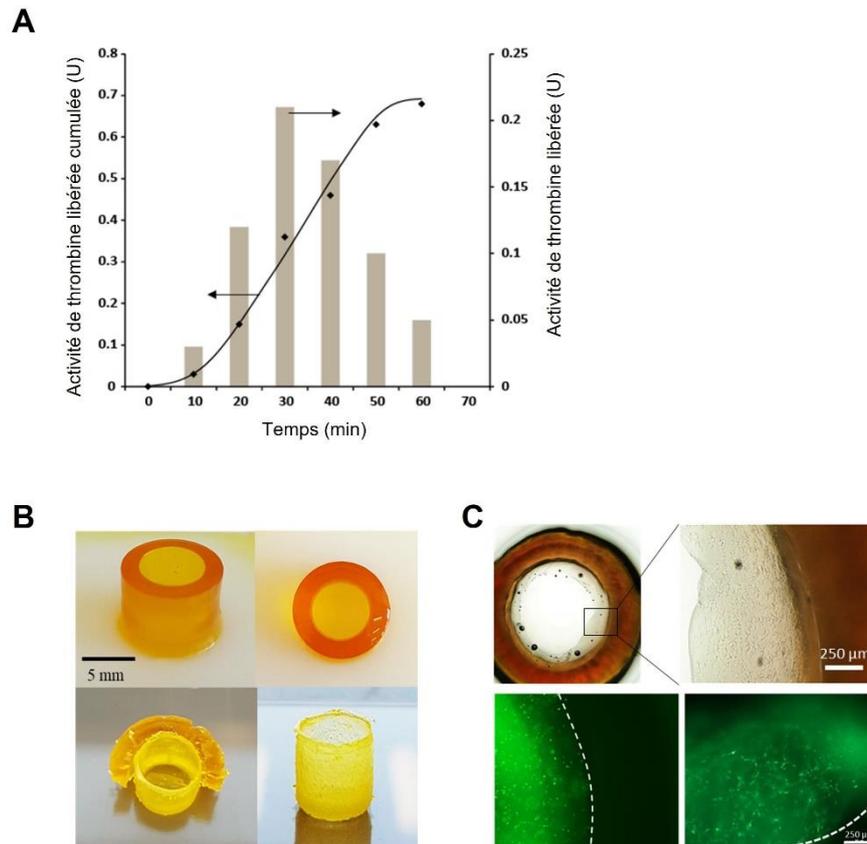


Figure 79 Structure vasculaire cellularisé obtenue par la méthode d'impression 4D. **(A)** Cinétique de libération de la thrombine à partir des pores de l'hydrogel de PEG700DA. **(B)** Photo de l'hydrogel de PEG700DA imprimé en 3D et renfermant la thrombine (en haut à gauche), hydrogel de PEG700DA pendant le dépôt de fibrinogène (en haut à droite), structure tubulaire de fibrine obtenu en contact avec l'hydrogel de PEG700DA (en bas à gauche) et la structure tubulaire de fibrine, après retrait de l'hydrogel 4D (en bas à droite). **(C)** Image d'une structure 4D contenant des NIH à l'intérieur du réseau de fibrine (en haut à gauche), une vue rapprochée de l'interface hydrogel/fibrine (en haut à droite), et une image en microscopie à fluorescence de la même zone après 24h de culture (en bas à gauche) et après 7 jours de culture (en bas à droite). La ligne pointillée représente la frontière entre l'hydrogel imprimé et la fibrine. Barre d'échelle 250 μ m.

Une structure vasculaire tubulaire, d'épaisseur fine (entre 100 et 200 μ m), a donc été obtenu grâce à la méthode d'impression 4D. L'avantage principal de cette approche est l'impression de n'importe quelle géométrie grâce à la technologie de photopolymérisation, ce qui n'était pas possible avec l'approche de bioimpression par microextrusion à 1 extrudeur. En effet des structures mimant un arbre vasculaire peuvent être imprimées pour permettre la formation de la même structure vasculaire complexe.

ii. Limites et solutions

Bien que cette méthode ait permis de créer une structure précurseur de haute résolution et de géométrie variable, la structure finale 4D obtenue est finalement régit uniquement par la diffusion enzymatique de la thrombine, qui reste un processus complexe à mettre en place ainsi qu'à contrôler. La nécessité d'imprimer dans un premier temps une structure servant de diffuseur enzymatique 4D reste une limitation et un besoin de simplifier la méthode au niveau fonctionnel est nécessaire. De plus, cette approche ne nous a permis de créer uniquement une seule couche sur les trois de la paroi vasculaire (Tableau 15).

Tableau 15 Résumé des limitations rencontrées lors de l'utilisation de l'impression 4D pour développer une structure tubulaire ainsi que les solutions à apporter.

LIMITATIONS RENCONTREE	SOLUTIONS A APPORTER
Utilisation d'une seule bioencres : structure tubulaire monocouche	Stratégies d'utilisation plusieurs bioencres
Processus d'impression 4D complexe	Utiliser une méthode d'impression 3D plus classique : la microextrusion
Nécessite 2 étapes de biofabrication afin d'obtenir une structure morphologiquement complexe	Méthode de biofabrication d'une structure complexe en 1 étape

Les paramètres clés du cahier des charge auxquels répond l'approche d'impression 4D sont identifiés dans la Figure 80.

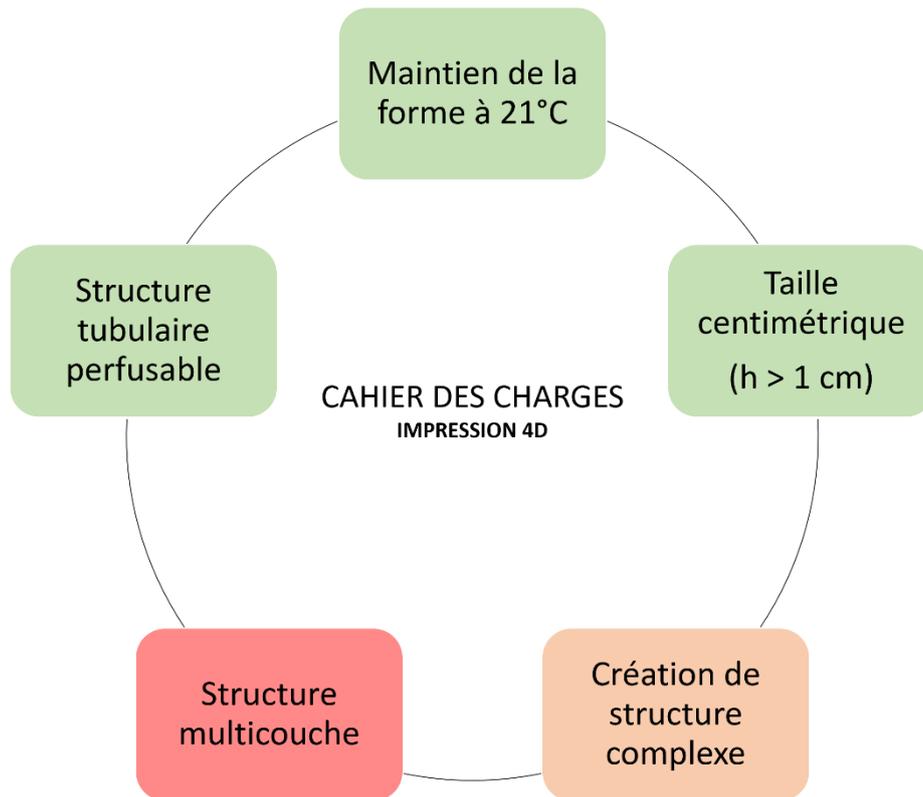


Figure 80 Paramètres du cahier des charges auxquels répond (vert), ne répond pas (rouge), et optimisables (orange), l'approche de biofabrication d'une structure tubulaire par impression 4D.

L'utilisation d'un système d'impression plus simple à mettre en œuvre ainsi que le développement d'une structure d'architecture plus complexe en 1 seule étape semble être nécessaire. La bioimpression 3D par extrusion classique est l'approche qui semble la plus adaptée. Cependant, comme nous avons vu avec la microextrusion à 1 extrudeur, aucune structure tubulaire dépassant 1 cm de hauteur et de plus haute résolution, n'est possible. Afin de répondre aux limitations rencontrées avec les deux approches que nous venons de voir, nous avons évalué une troisième méthode : la bioimpression 3D en milieu contraint.

III.1.4. La bioimpression en milieu contraint

Les structures vasculaires sont par définition creuses. Leur formation sans support, est complexe et engendre dans la plupart des cas des limitations de tailles et de morphologies. Pour débloquent ce verrou, nous avons étudié la possibilité d'utiliser un milieu contraint formé de microparticules de gélatine, servant de support à la bioencres lors de son extrusion. En effet, nous nous sommes basé sur la technologie FRESH^{306,448,449} (*Freeform Reversible Embedded*

Support Hydrogel) développée en 2019. Cette technique utilise un hydrogel comme support temporaire thermoréversible, qui peut être éliminé après l'étape d'impression. Le réactif principal de support FRESH est composé de microparticules de gélatine. Le matériau ainsi formulé est biocompatible et offre un support temporaire aux matériaux démontrant des limitations d'impression. En plus de servir de support, les microparticules de gélatine sont en suspension dans une solution de calcium, permettant une consolidation immédiate de la bioencre à travers la chélation de l'alginate.

i. Etude de faisabilité

Nous avons formulé un milieu contraint à base de microparticules de gélatine en suspension dans une solution de consolidation de CaCl_2 . Une bioencre a ensuite été extrudée directement à l'intérieur de ce milieu contraint (Figure 81). Nous avons évalué la possibilité de formation de structures tubulaires mais aussi de structures plus complexes, mimant un arbre vasculaire.

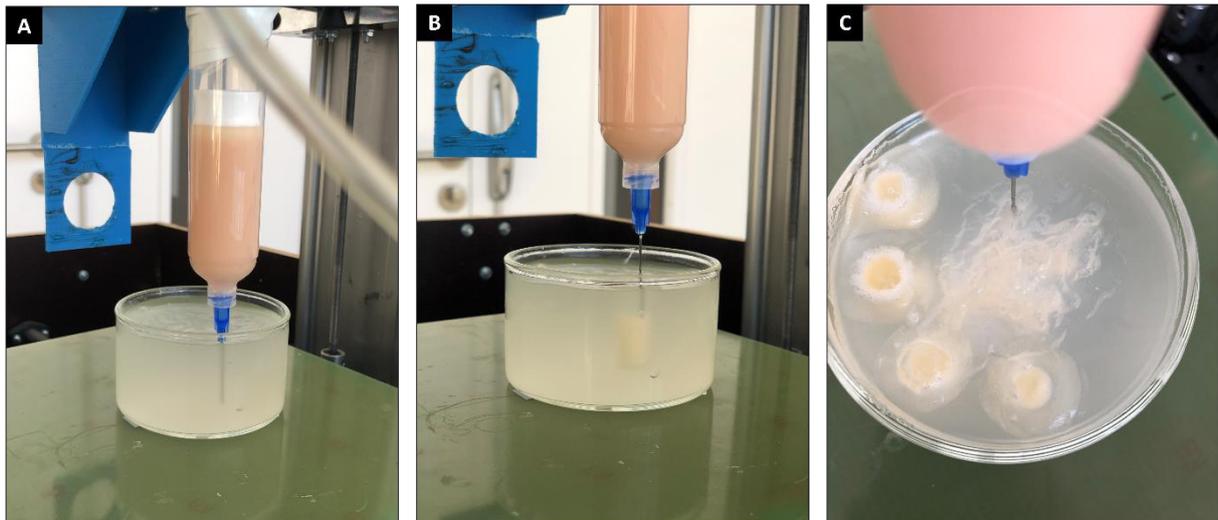


Figure 81 Bioimpression 3D à l'intérieur d'un milieu contraint composé d'une suspension de microparticules de gélatine dans une solution de consolidation à base de CaCl_2 . **(A)** Aiguille plongée à l'intérieur du milieu contraint. **(B)** Bioimpression en cours de la bioencre dans le milieu contraint. **(C)** Vue du dessus de la bioimpression de plusieurs structures à l'intérieur du milieu contraint.

Le milieu contraint étant thermoréversible, après l'étape de bioimpression, une incubation à 37°C permet aux microparticules de gélatine de retrouver un état liquide et de libérer ainsi les objets 3D bioimprimés.

Grâce à la méthode de bioimpression supportée, des tubes d'une hauteur de plus de 4 cm, de paroi d'épaisseur de $400\ \mu\text{m}$ et des morphologies vasculaires complexes et creuses ont été

bioimprimés (Figure 82). Ces structures n'étaient pas réalisables avec la microextrusion à 1 extrudeur.

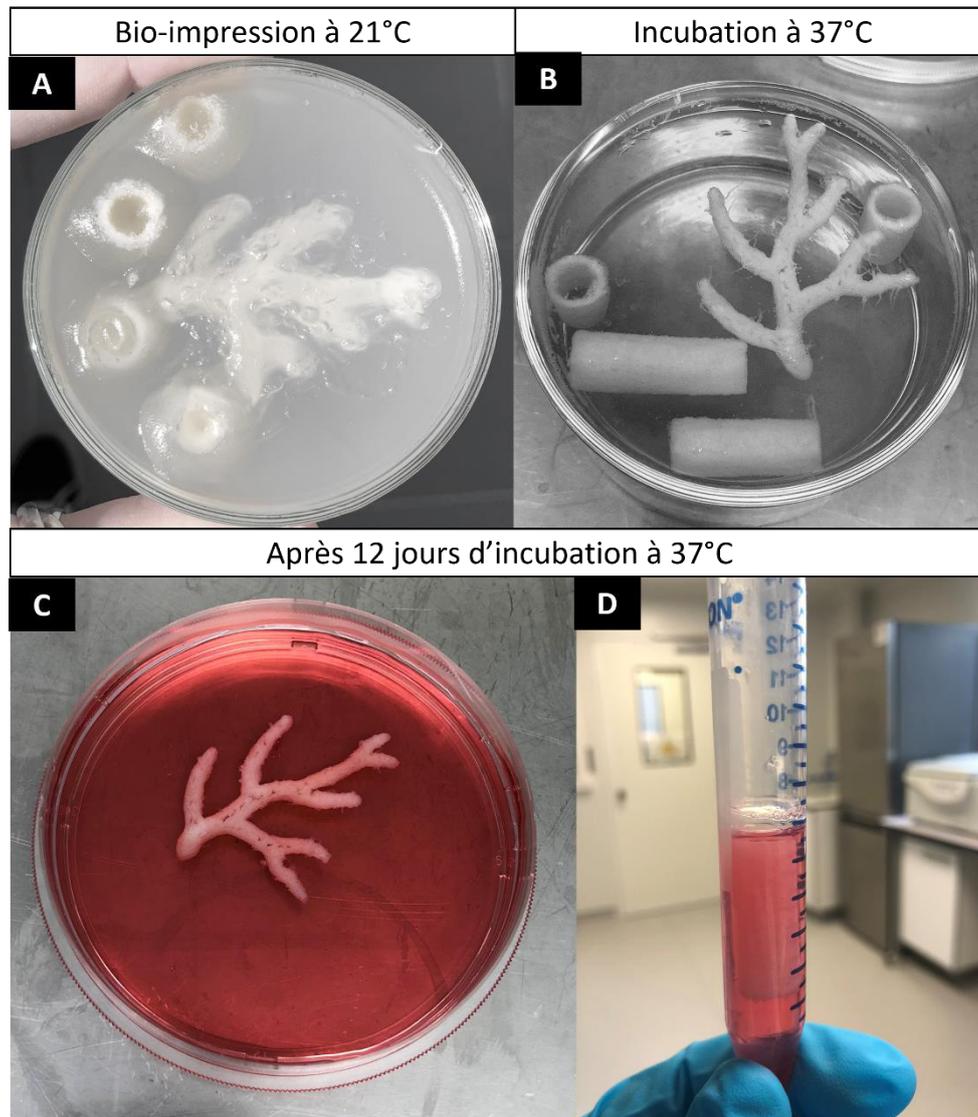


Figure 82 Différentes structures tubulaires bioimprimées dans le gel de microparticules de gélatine. **(A)** Les structures 3D sont piégées à l'intérieur de l'hydrogel de microparticules de gélatine à 21°C. **(B)** Les structures 3D sont libérées du gel de microparticules de gélatine qui s'est liquifié lors de son incubation à 37°C. **(C)** Image sd'une structure d'arbre vasculaire complexe bioimprimée grâce à l'approche de milieu contraint. **(D)** Structure tubulaire monocouche avec une paroi d'épaisseur de 400 μm , en culture dans du milieu de culture avec un maintien de la forme.

ii. Limites et solutions

Bien que des structures de haute fidélité aient pu être biofabriquées, des limitations sont tout de même observées. En effet, l'utilisation toujours présente d'un seul extrudeur et par le fait, d'une seule composition de bioencres, demeure une limitation à la création d'une structure vasculaire multicouche (Tableau 16).

Tableau 16 Résumé des limitations rencontrées lors de l'utilisation de la bioimpression dans un milieu contraint en microparticules de gélatine pour développer une structure tubulaire ainsi que les solutions à apporter.

LIMITATIONS RENCONTREES	SOLUTIONS A APPORTER
Objet 3D tubulaire mais monocouche	Développement d'un système permettant d'utiliser plusieurs bioencres à la fois
Système de bioimpression avec une impossibilité d'échanger de bioencres durant la bioimpression	Bioimpression d'un système d'extrusion avec têtes multiple.

Les paramètres clés du cahier des charge auxquels répond l'approche de bioimpression en milieu contraint sont identifiés dans la Figure 83.

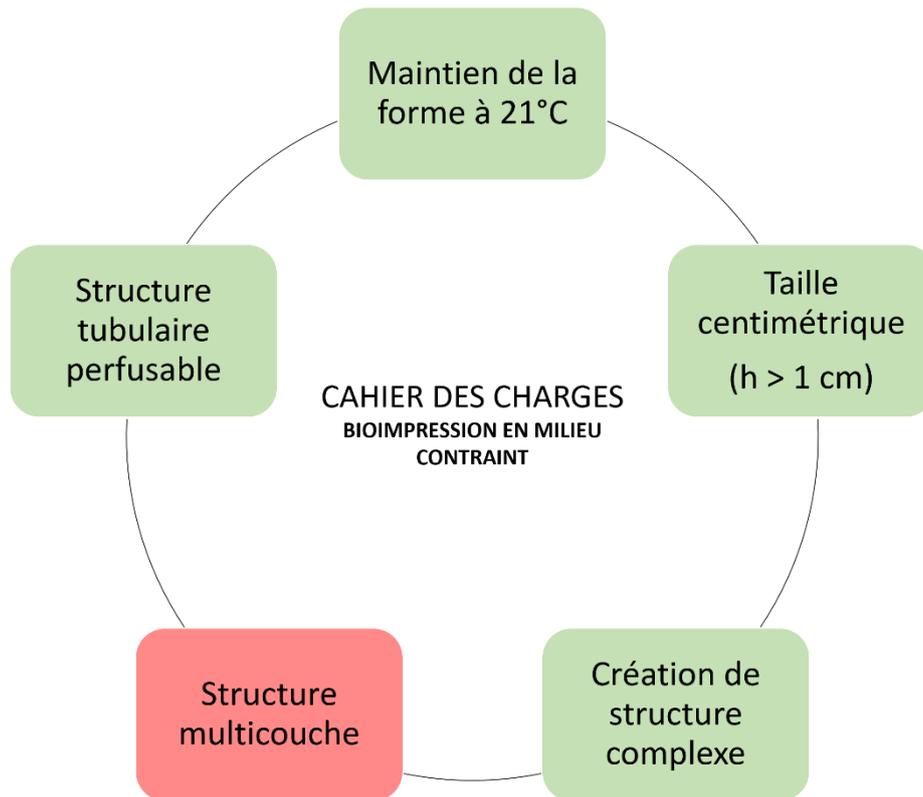


Figure 83 Paramètres du cahier des charges auxquels répond (vert) ou ne répond pas (rouge), la bioimpression 3D dans un hydrogel de microparticules de gélatine.

Le point fort de cette méthode est la complexité morphologique des objets bioimprimés. Cependant, celui-ci ne répond pas au critère d'une structure multicouche. Nous avons donc évalué une quatrième méthode nous permettant de créer des structures tubulaires et multicouches : la bioimpression multicouche par enroulement.

III.1.5. La bioimpression multicouche par enroulement

Cette méthode utilise la technique de bioimpression par microextrusion standard à un extrudeur. Cependant, nous allons utiliser plusieurs bioencres de compositions cellulaires différentes durant cette approche. En effet, chacune des bioencres représentant une des couches de la paroi vasculaire, va être bioimprimée de manière successive, les unes à la suite des autres. Puis cette structure de type *patch*, composée de trois couches cellularisées sera alors enroulée autour d'un tube de polymère stérilisé afin d'obtenir une structure tubulaire mimant les trois couches vasculaires.

i. Etude de faisabilité

Pour cette étude, la bioencres utilisée est celle définie dans le chapitre III, composée de gélatine, d'alginate et de fibrinogène. Les trois couches de compositions en biomatériaux identiques mais de composition cellulaire différente, de dimension 0,4 mm d'épaisseur, 2,5 mm de longueur et 1,5 mm de largeur, ont été bioimprimées successivement. La première bioencres ensemencée de fibroblastes est bioimprimée, puis un changement de seringue est effectué pour placer la bioencres ensemencée de CMLV dans la bioimprimante et enfin, la dernière bioencres, ensemencée d'HUVEC, est bioimprimée sur les deux couches précédentes.

Lorsque les trois couches différentes sont bioimprimées, un tube stérile en polyéthylène poreux est utilisé pour enrouler les trois couches. La bioencres étant constituée de gélatine, elle possède des propriétés adhésives à 21°C et permet de maintenir la structure autour du tube. L'étape de consolidation par une solution de CaCl₂ et de thrombine va permettre de stabiliser cette structure pour qu'elle garde cette conformation tubulaire tout au long de la maturation cellulaire. L'utilisation d'un tube poreux permet une diffusion homogène de la solution de polymérisation dans la partie interne de l'objet bioimprimé (Figure 84).

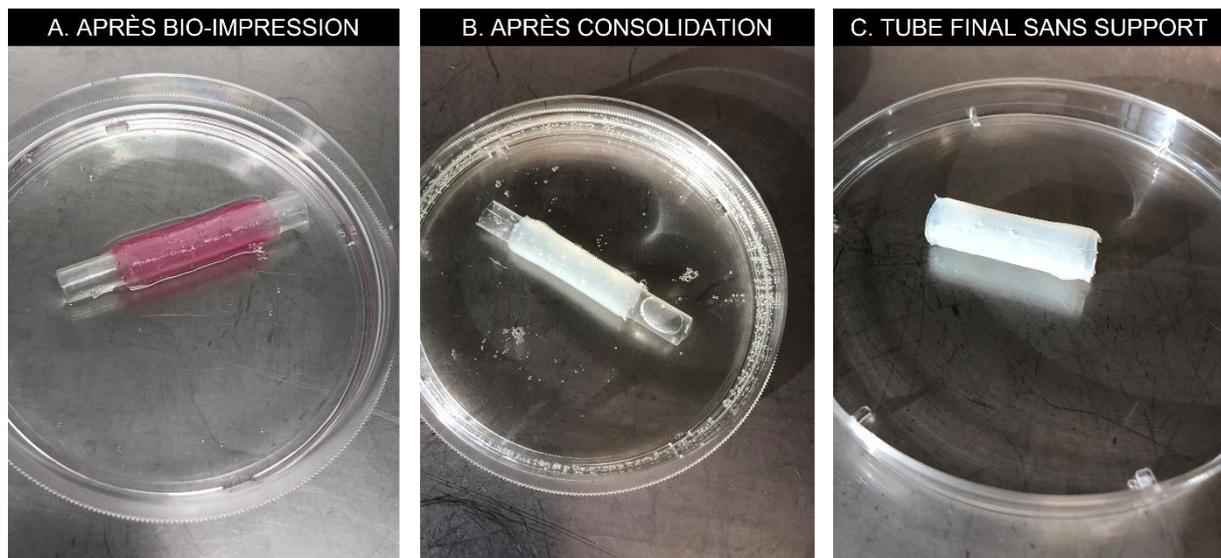


Figure 84 Images de structures tubulaires biofabriquées grâce à l'approche de feuillets cellulaires enroulés. **(A)** Enroulement des différentes couches cellularisées autour du tube poreux. **(B)** Consolidation de la structure grâce à une solution de calcium et de thrombine, permettant de « souder » les extrémités du tube et de maintenir la structure en forme de tube. **(C)** Image de la structure tubulaire finale après retrait du tube poreux.

ii. Limites et solutions

Cette technique de bioimpression par enroulement est pour l’instant la méthode la plus pertinente pour répondre à notre objectif de création d’une structure tubulaire formée de plusieurs couches. Cependant, certaines limitations sont apparues. En effet, deux étapes sont nécessaires avec (i) une première étape de bioimpression des couches cellularisées les unes à la suite des autres puis (ii) une étape de formation de la structure tubulaires par enroulement. Cette deuxième étape s’est révélée la plus limitante car elle est réalisée manuellement avec une obligation de manipuler l’objet cellularisé, ce qui n’est pas optimal pour le maintien d’une stérilité. Enfin, il n’est pas possible de créer des structures complexes telles que des ramifications vasculaires (Tableau 17).

Tableau 17 Résumé des limitations rencontrées lors de l'utilisation de la bioimpression 3D par enroulement ainsi que les solutions à apporter.

LIMITATIONS RENCONTREES	SOLUTIONS A APPORTER
Nécessite 2 étapes successives	Bioimpression par une approche directe, à 1 étape
Procédé d’enroulement manuel	Formation d’une structure multicouche de manière directe par impression
Pas de structures complexes réalisables, telles que des ramifications vasculaires	Nouvelle approche de biofabrication

Les paramètres clés du cahier des charge auxquels répond l’approche de bioimpression multicouche par enroulement, sont identifiés dans la Figure 85.

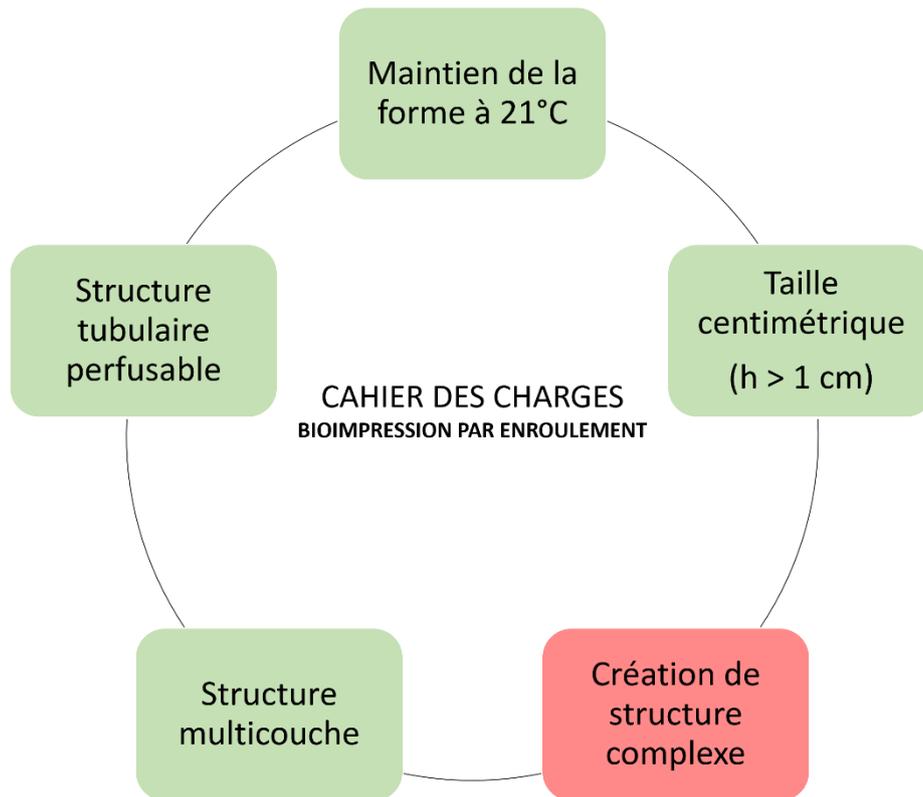


Figure 85 Paramètres du cahier des charges auxquels répond (vert) et ne répond pas (rouge) la bioimpression 3D multicouche par enroulement.

L'atout majeur de cette technique est la facilité de mise en œuvre d'une structure tubulaire représentant les trois couches vasculaires. En revanche, le procédé d'enroulement manuel n'est pas optimal et nécessite une amélioration. Pour essayer de répondre à cela, nous allons étudier la possibilité de créer un tube multicouche en une seule étape grâce au développement d'une cinquième technique : la bioimpression coaxiale.

III.1.6. La bioimpression coaxiale

La bioimpression coaxiale est une technologie permettant d'envisager le dépôt simultané de plusieurs encres lors d'une même bioimpression. La buse classique utilisée lors d'une bioimpression par microextrusion est simplement remplacée par une buse coaxiale à deux, ou trois connexions. Les buses utilisées sont fabriquées par la compagnie Ramé-art instrument (USA). Elles sont soit préconstruites selon des dimensions précises proposées directement par le fabricant, soit personnalisées suivant les besoins des utilisateurs. Chacune

des buses coaxiales est composée en réalité de deux micro-aiguilles de diamètres différents, enchâssées l'une dans l'autre (Figure 86). Lors des premiers essais, nous avons utilisés deux modèles de buses : le modèle 1814 et le modèle 2218. Le modèle 1814 étant celui possédant les diamètres les plus élevés des micro-aiguilles interne et externe, le modèle 2218 étant celui possédant les diamètres les plus faibles.

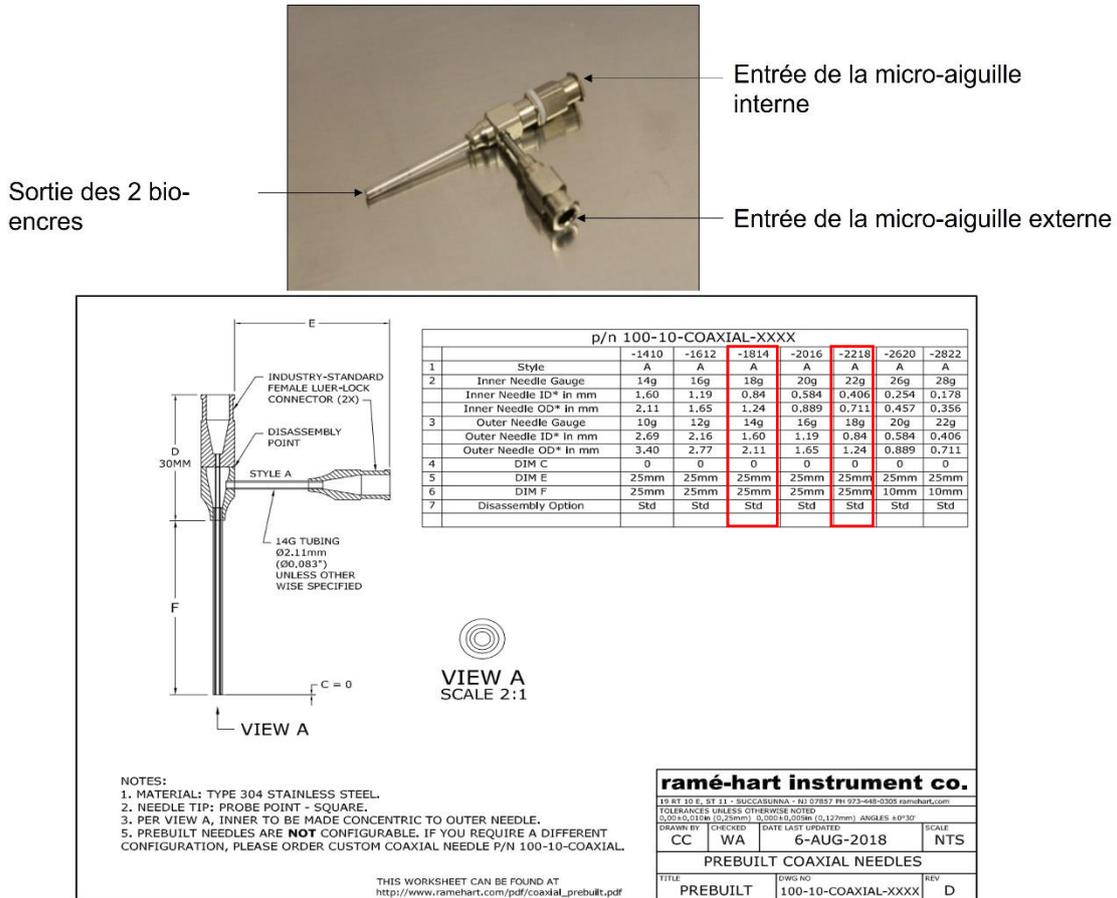


Figure 86 Photo d'une aiguille coaxiale du fabricant Ramé-art instrument, composée de deux entrées pour seringues d'impression 3D. Les buses de modèles 1814 et 2218 ont été testé durant cette étude.

i. Etude de faisabilité

Pour étudier la faisabilité de cette technologie nous avons formulé deux bioencres de composition en biomatériaux identique (gélatine, alginate et fibrinogène), mais de composition cellulaire différentes : une bioencre de fibroblastes et une bioencre d'HUVEC.

Nous avons commencé notre étude avec la buse 2218. La bioencre d'HUVEC extrudée au cœur de la buse est parfaitement imprimable. Cependant la bioencre de fibroblastes extrudée à

l'extérieur à travers une ouverture de 0,3 mm est impossible et entraîne une perte de charge élevée. Le modèle 2218 a alors été écarté de l'étude au profit du modèle 1814.

Ce second modèle possède des dimensions de microaiguilles interne et externe de 1 mm et de 1,6 mm, soit une épaisseur d'anneau externe de 0,6 mm ($1,6 - 1 = 0,6$). Dans ces conditions, les deux bioencres sont imprimables.

La bioencres d'HUVEC et la bioencres de fibroblastes ont ainsi pu être extrudées simultanément grâce à l'application d'une pression pneumatique sur chacune des seringues. Des exemples d'objets 3D ainsi biofabriqués sont présentés sur la Figure 87.

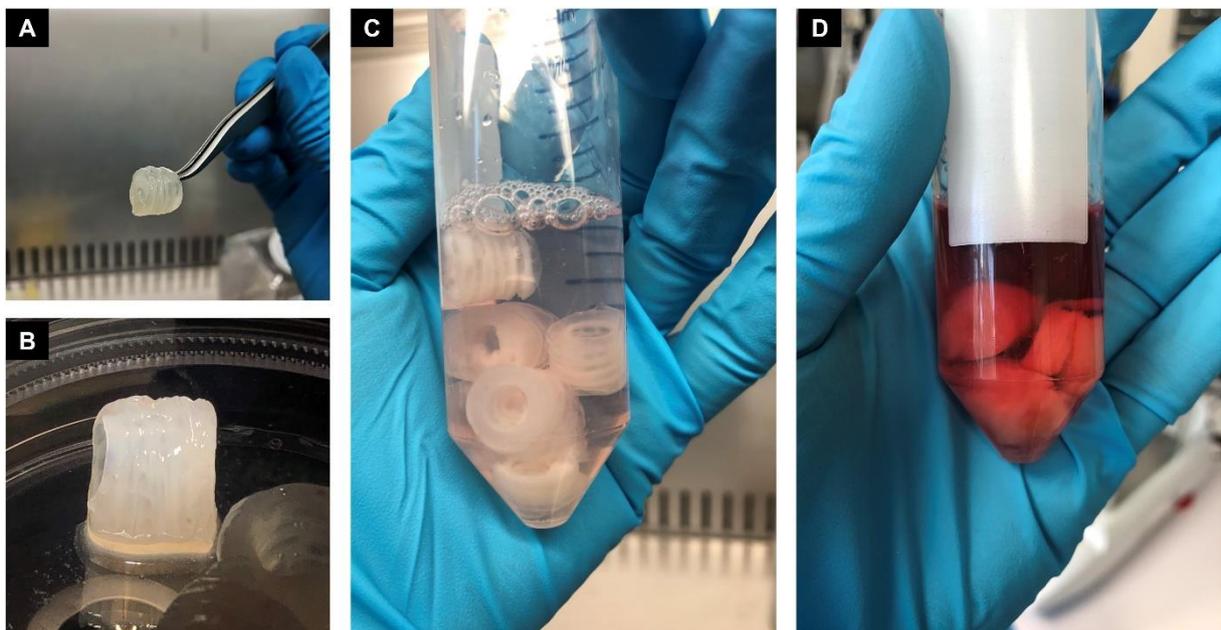


Figure 87 Photos des tubes bioimprimés grâce à la technologie de bioimpression 3D coaxiale. **(A)** Tube d'environ 1 cm de hauteur et 1 mm d'épaisseur de paroi. **(B)** Vue rapprochée d'un tube de 1 cm de hauteur, sur sa tranche, permettant d'observer une tenue mécanique. **(C)** Plusieurs tubes bioimprimés directement après consolidation. **(D)** Affaissement et dégradation des tubes après 24h d'incubation à 37°C.

ii. Limites et solutions

La technologie coaxiale nous a permis de fabriquer des tubes en utilisant deux bioencres de composition cellulaire différentes et lors d'une seule étape de biofabrication, ce qui n'était pas le cas avec la méthode d'enroulement (2 étapes obligatoires). Cependant, l'objet biofabriqué ne correspond pas réellement à une structure multicouche vasculaire. En effet, la

couche de bioencres d'HUVEC est en réalité enrobée dans la couche de bioencres de fibroblastes, comme schématisé sur la Figure 88.

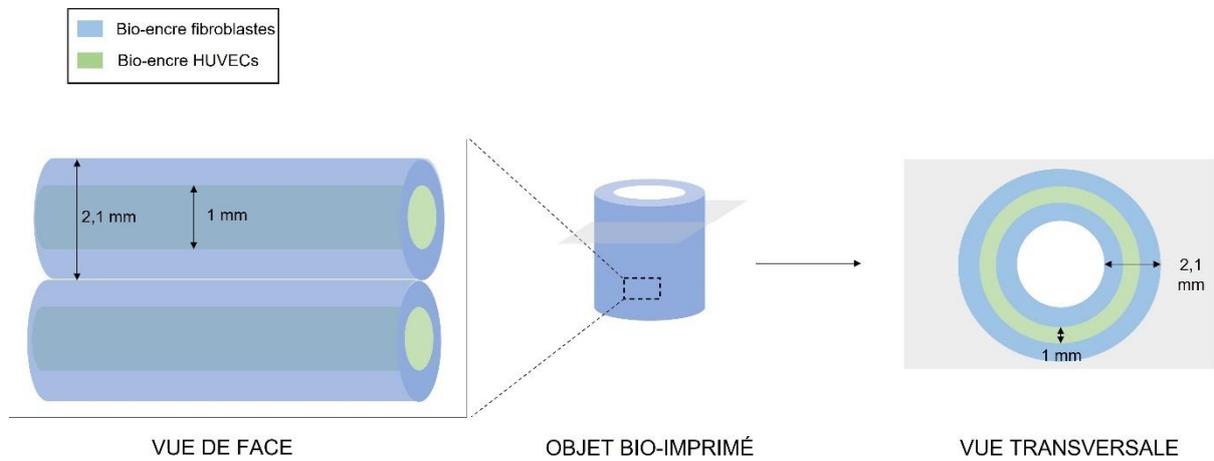


Figure 88 Schéma représentant l'organisation de la bioencres de fibroblastes et la bioencres d'HUVEC, bioimprimées simultanément à l'intérieur d'une même structure tubulaire. Une vue de face des filaments extrudés et une vue transversale de ces mêmes filaments nous permet d'identifier la structure complexe développée.

Les limitations rencontrées lors de l'utilisation de la bioimpression coaxiale ainsi que les solutions à apporter sont résumées dans le Tableau 18.

Tableau 18 Résumé des limitations rencontrées lors de l'utilisation de la bioimpression coaxiale et les solutions à apporter.

LIMITATIONS RENCONTREES	SOLUTIONS A APPORTER
Faible tenue mécanique lors de l'impression donc faible fidélité de l'objet	Ajouter un support de l'impression ou une solution de consolidation immédiatement après extrusion
Objet ne mimant pas réellement la structure multicouche d'un vaisseau sanguin	Utilisation d'un système triaxiale

Les paramètres clés du cahier des charge auxquels répond l'approche de bioimpression coaxiale, sont identifiés dans la Figure 89.

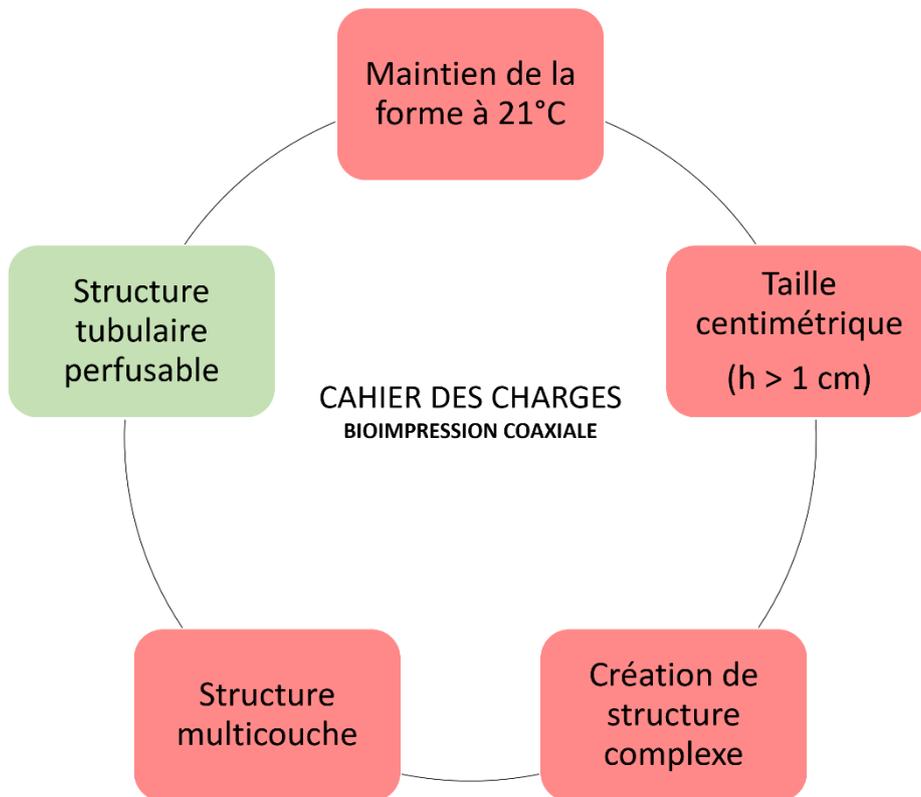


Figure 89 Paramètres du cahier des charges auxquels répond (vert) et ne répond pas (rouge) la bioimpression 3D coaxiale.

Le point fort de cette approche de bioimpression coaxiale est le développement d'un objet multi bioencres composé de couches de fibroblastes enrobant des couches d'HUVEC. Cependant, quand nous regardons cette architecture en détail, elle ne mime pas celle d'une paroi vasculaire, censée représentée trois couches cellulaires bien distinctes et séparées. De plus, la fidélité de l'objet lors de la bioimpression reste faible.

Nous avons donc évalué une quatrième méthode permettant de biofabriquer une structure multicouche tubulaire : la bioimpression triaxiale.

III.1.7. La bioimpression triaxiale

Avec cette approche, notre objectif est de biofabriquer une structure tubulaire bicouche de manière directe. Deux couches de la paroi vasculaire vont pouvoir être biofabriquées *via* cette méthode.

Le principe de bioimpression triaxiale est identique à celui de la bioimpression coaxiale. La différence réside dans l'utilisation d'une buse permettant la fixation d'une troisième seringue d'impression, comme illustré sur la Figure 90.

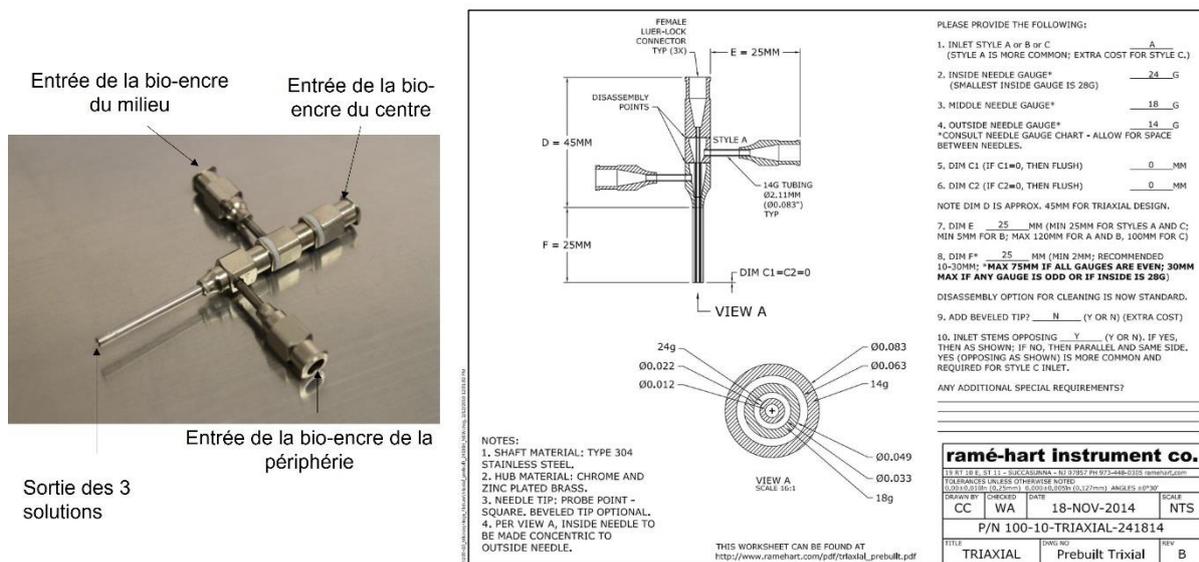


Figure 90 Photo et représentation schématique d'une seringue d'impression triaxiale. Elle possède une entrée supplémentaire. Trois bioencres peuvent alors être extrudées en même temps.

A l'aide de ce dispositif, trois seringues d'impression peuvent être fixées à la buse puis extrudées en même temps. Pour cette approche, nous avons fait fabriquer une buse triaxiale de modèle 181410, avec des diamètres respectifs des micro-aiguilles de l'intérieur vers l'extérieur de : 1,0 mm, 1,6 mm et 2,6 mm.

i. Etude de faisabilité

L'approche que nous avons décidé de mener est celle d'utiliser ce modèle de buse triaxiale comme un système de fabrication directe d'une structure tubulaire multicouche. Pour cela et comme pour la méthode coaxiale précédente, deux bioencres de composition identique en biomatériaux (alginate, gélatine et fibrinogène) maisensemencées par des cellules

différentes, ont été utilisées. Une bioencreensemencée par des fibroblastes va permettre la création de la paroi externe du tube et une bioencreensemencée par des HUVEC va permettre la création de la paroi interne du tube. Lors de l'extrusion simultanée de ces deux bioencres, pour améliorer la tenue mécanique de l'objet et pour éviter que ses parois ne se collent et bouchent la lumière du tube, nous avons utilisé dans la 3^{ème} seringue une solution de consolidation (CaCl_2 et thrombine), extrudée par l'aiguille centrale du tube (Figure 91). Cette action va permettre à la fois de maintenir une forme tubulaire creuse tout au long de la bioimpression, mais aussi de consolider la structure directement pendant sa formation. Effectivement, la structure ne mesurant que $600\ \mu\text{m}$ d'épaisseur pour la paroi d'HUVEC et $1,0\ \text{mm}$ d'épaisseur pour la paroi de fibroblastes, elle demeure très fragile lors de la bioimpression. Cette phase concomitante de consolidation permet alors consolider au fur et à mesure la structure bioimprimée.

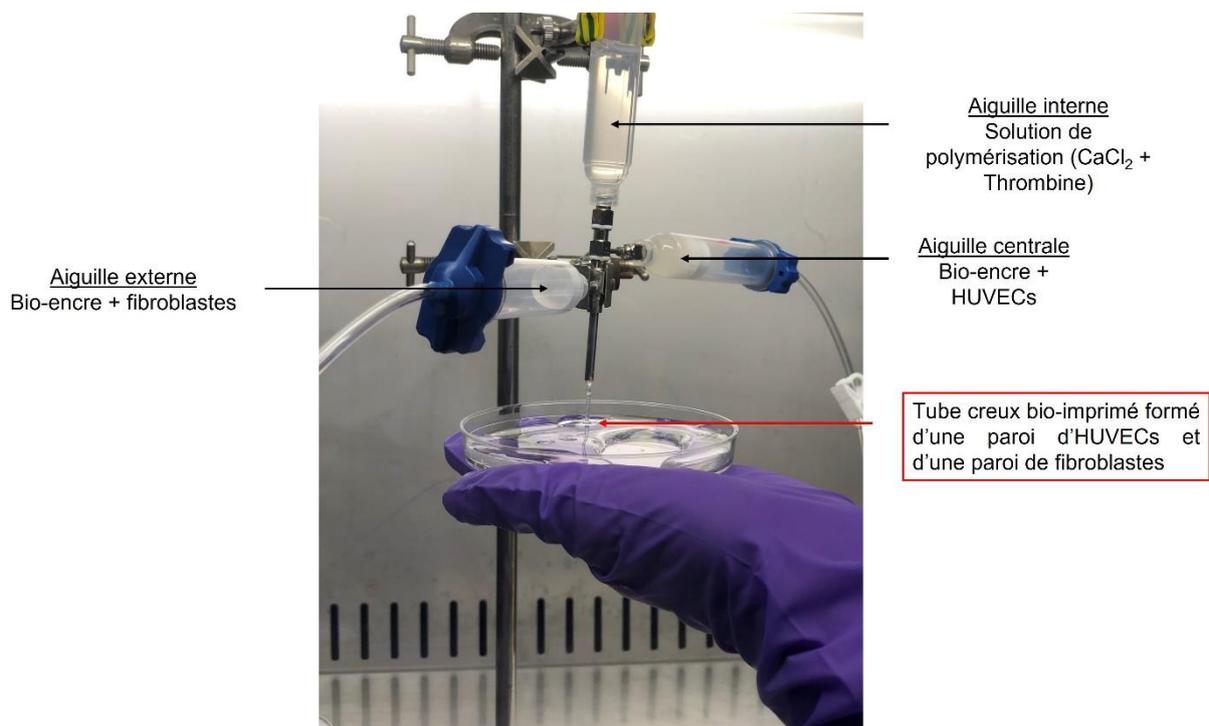


Figure 91 Principe de la bioimpression triaxiale. Une bioencre contenant des fibroblastes, une bioencre contenant des HUVEC et une contenant une solution de consolidation (CaCl_2 et thrombine) sont extrudées en même temps.

Le point fort de cette méthode est la possibilité de former, pour la première fois, une structure tubulaire, creuse et composée d'une paroi interne de cellules endothéliales (HUVEC) et d'une paroi externe de fibroblastes, en une seule étape de bioimpression (Figure 92).

De plus, la Figure 92A nous révèle la présence d'une lumière interne perfusable.

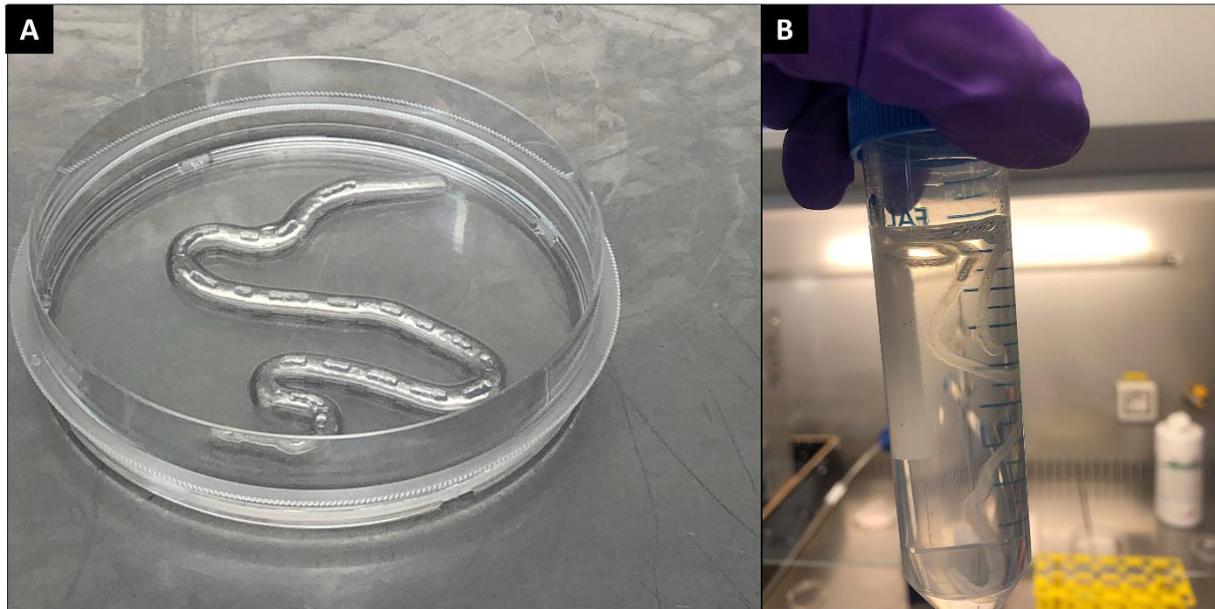


Figure 92 Structure vasculaire obtenue par bioimpression triaxiale. **(A)** Structure vasculaire 3D directement après bioimpression coaxiale, **(B)** structure vasculaire en suspension dans la solution de consolidation.

ii. Limites et solutions

Bien que cette méthode nous ait permis le développement d'une structure vasculaire, perfusable et composée de deux parois de composition cellulaire différente, ce qui demeurerait impossible avec les méthodes précédentes, des limitations sont observées et des solutions envisagées (Tableau 19).

Tableau 19 Résumé de la limitation rencontrée lors de l'utilisation de la bioimpression triaxiale ainsi que la solution à apporter.

LIMITATION RENCONTREE	SOLUTION A APPORTER
Structure formée uniquement de morphologie linéaire	Complexification de l'outils de fabrication

La bioimpression triaxiale est une technique permettant de créer une structure vasculaire possédant deux parois cellulaires différentes, en une seule étape. Pour pouvoir créer la troisième couche vasculaire, une buse possédant une quatrième entrée devra être utilisée, apportant de la complexité au processus de bioimpression.

Les paramètres clés du cahier des charge auxquels répond l'approche de bioimpression triaxiale, sont identifiés dans la Figure 93.

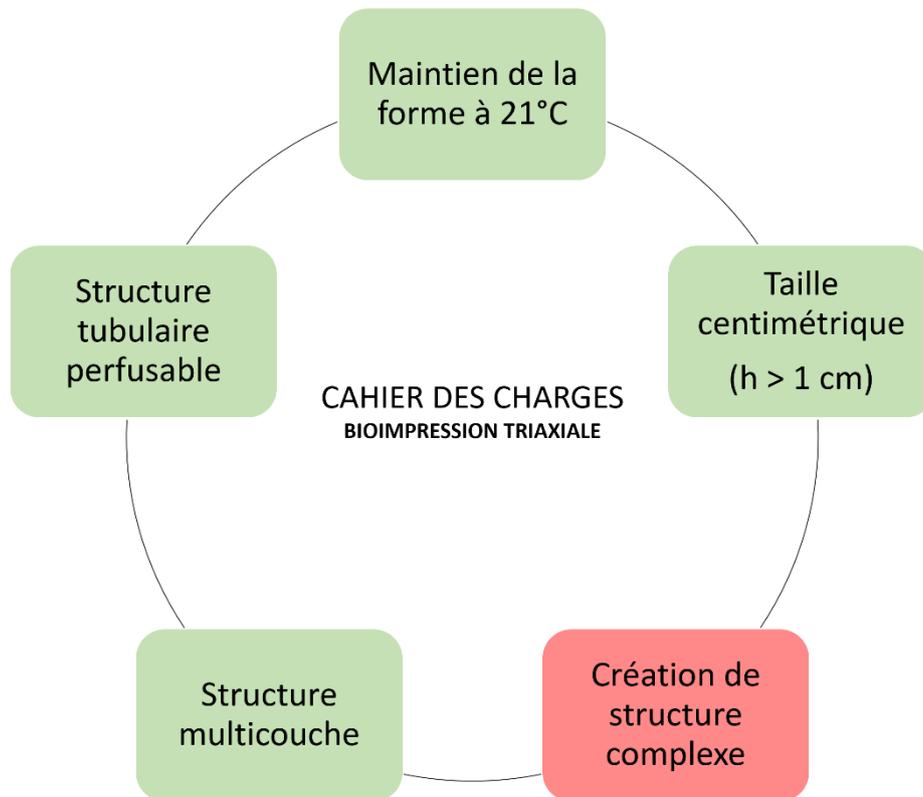


Figure 93 Paramètres du cahier des charges auxquels répond (vert) et ne répond pas (rouge) la bioimpression triaxiale.

Enfin, une dernière technique, permettant de réaliser des structures tubulaires multicouches a été développée au sein du laboratoire : la bioimpression par microextrusion à multi-extrudeurs.

III.1.8. La bioimpression par microextrusion multi-extrudeur

Grâce aux techniques précédentes nous avons réussi à former des structures de hautes résolutions et de morphologies complexes (bioimpression dans un milieu contraint) mais aussi des structures multicouches (bioimpression triaxiale, bioimpression par enroulement). Cependant, la création d'une structure multicouche, tubulaire, en une seule étape de bioimpression reste complexe à mettre en œuvre. Afin de répondre à ce cahier des charges, la solution idéale serait l'utilisation de la bioimpression par microextrusion, possédant plusieurs extrudeurs d'impression, lors d'une même étape de bioimpression.

Un critère supplémentaire de conception serait que ces trois seringues d'impression soient connectées à la même buse d'impression pour pouvoir alterner les bioencres au fur-et-à-mesure de la bioimpression, en fonction de la couche vasculaire à fabriquer (Figure 94). Les trois bioencres étant de composition en biomatériaux identique mais de compositions cellulaires différentes pour mimer les différentes parois du vaisseau sanguin (cellules endothéliales, cellules musculaires lisses vasculaires et fibroblastes).

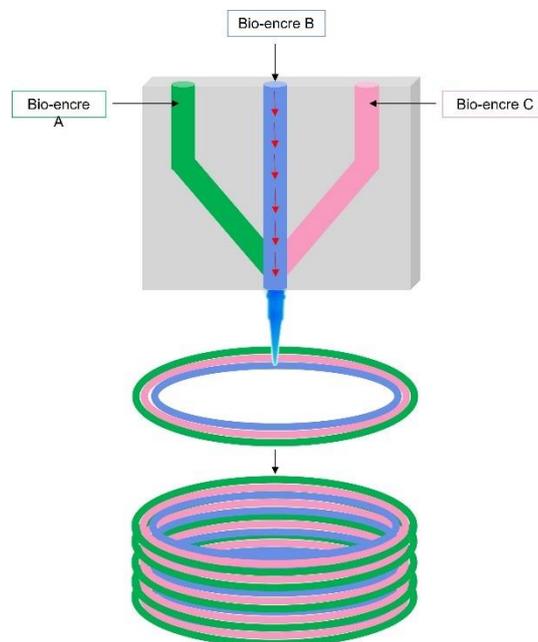


Figure 94 Schéma représentant le principe de bioimpression par extrusion à multi extrudeur. Trois bioencres différentes peuvent être co-imprimées (verte, bleue et orange) dans la même structure et à l'aide d'une seule aiguille d'impression.

Cependant il n'existe pas sur le marché de système permettant de connecter trois seringues d'impression ensemble, extrudées indépendamment les unes des autres, mais à travers la même sortie, c'est-à-dire la même buse d'impression. Nous avons donc créé notre propre système multi-extrudeur sur notre bioimprimante 3D.

i. Prototype v1

Etude de faisabilité

Dans un premier temps nous avons utilisé des connecteurs du fabricant Diba Omnifit® possédant une double fonctionnalité : (i) un embout de connexion pour les seringues d'impression et (ii) un embout de connexion pour les aiguilles d'impression. Ce modèle de connecteur, le seul sur le marché, correspondait exactement à notre objectif. Nous avons ensuite formulé trois bioencres de couleur différente, ce qui permet de les différencier durant l'impression et valider notre modèle. Les trois seringues d'impression sont alors connectées chacune un à un embout Diba Omnifit® et une aiguille conique de 400 µm est connectée à la dernière sortie. Chacune des seringues d'impression est ensuite reliée à un système de pression pneumatique. Une fois le système mis en place sur la bioimprimante 3D équipée d'un support, conçu et imprimé par nos soins (support bleu), permettant le maintien des seringues, la bioimpression 3D d'une structure vasculaire à trois couches peut être lancée (Figure 95).

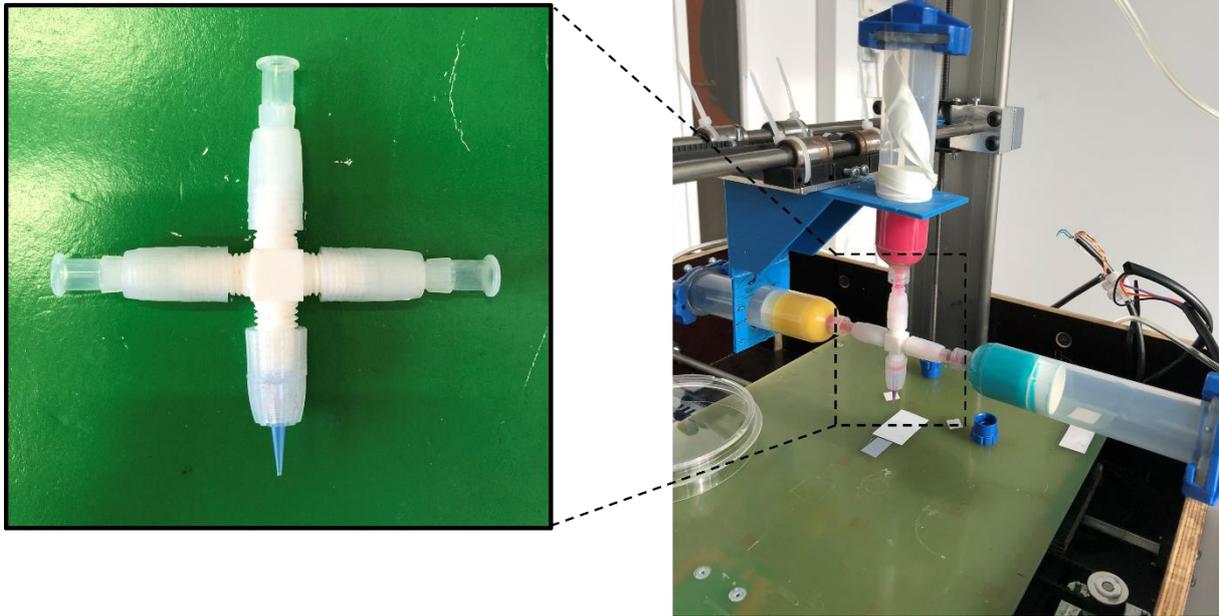


Figure 95 Prototype v1 du système de bioimpression par extrusion multi-extrudeurs.

Limites et solutions

Un problème majeur a été rencontré durant la bioimpression : la pression appliquée sur la seringue active crée un retour de pression de bioencres à l'intérieur des autres seringues d'impression. En somme, au fur et à mesure de la bioimpression, les bioencres se mélangent dans les différentes seringues (Tableau 20).

Tableau 20 Résumé de la limitation rencontrée lors de l'utilisation du prototype v1 du système multi-extrudeurs ainsi que la solution à apporter.

LIMITATION RENCONTREE	SOLUTION A APPORTER
Mélange des bioencres à l'intérieur des seringues lors de l'application d'une pression sur la seringue active	Utilisation d'un système multi-extrudeur avec 3 sorties de buses distinctes

ii. Prototype v2

Etude de faisabilité

Pour solutionner les limitations rencontrées avec l'utilisation du prototype v1, nous avons décidé de créer notre propre système de connecteur multi-extrudeur. Les pièces que nous avons développées ont été conçues grâce à un logiciel de conception assistée par ordinateur (CAO), SolidWorks™, puis fabriquées grâce à une imprimante à jet d'encre Stratasys™, utilisant une résine acrylique biocompatible et stérilisable.

Pour pallier le problème de mélange des bioencres pendant la bioimpression, nous avons donc développé un système composé de trois canaux indépendants, correspondant à la sortie de chacune des trois bioencres (Figure 96).

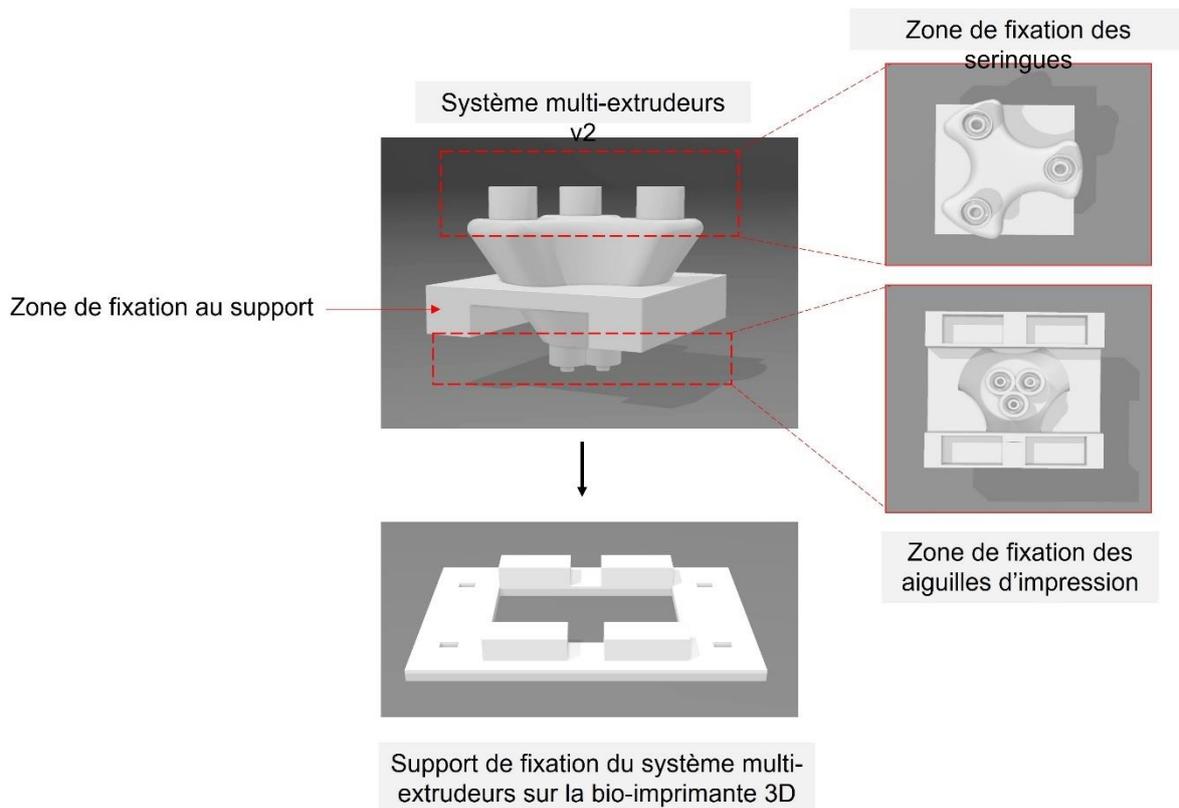


Figure 96 Fichier CAO du prototype v2 du système de bioimpression par extrusion multi-extrudeurs. Trois sorties sont présentes permettant de fixer trois aiguilles d'impression différentes.

Limites et solutions

La limitation principale de ce prototype v2 est l'utilisation de trois aiguilles indépendantes pour chacune des sorties de bioencre. En effet le problème de retour de pression que nous

avons avec le prototype v1 est réglée, cependant l'utilisation de trois aiguilles entraîne un réglage complexe des offsets. La taille des aiguilles n'étant pas parfaitement identiques, lors de l'extrusion d'une bioencres pour former une des trois couches vasculaires, les deux autres aiguilles sont trop proches et touche la couche en cours de développement (Figure 97).

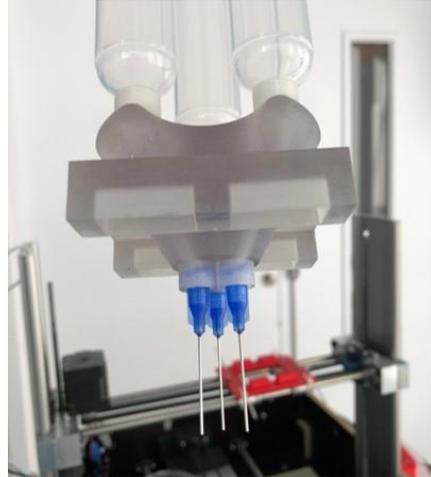


Figure 97 Image du prototype v2 montrant les aiguilles d'impression fixées et très rapprochées les unes des autres.

Les limitations rencontrées lors de l'utilisation du prototype v2 ainsi que les solutions à apporter avec un prototype v3, sont résumées dans le Tableau 21.

Tableau 21 Résumé des limitations rencontrées lors de l'utilisation du prototype v2 composée de trois aiguilles d'extrusion, ainsi que les solutions à apporter.

LIMITATIONS RENCONTREES	SOLUTIONS A APPORTER
Utilisation de trois aiguilles d'extrusion différentes	Développement d'un système multi-extrudeur à 1 seule aiguille de sortie
Retour de pression dans les seringues d'impression	Création d'un système de valve anti-retour pour chaque seringue d'impression

iii. Prototype v3

Etude de faisabilité

Nous sommes alors repartis sur notre idée de départ de n'utiliser qu'une seule et même aiguille d'impression pour les trois bioencres. Cependant, pour éviter tout retour de pression

dans les seringues, nous avons conçu une valve anti-retour spécifique à notre dispositif de connecteur multi-extrudeur. Une valve anti-retour pour chacun des connecteurs de seringues a alors été créé grâce au logiciel de CAO SolidWorks™ (Figure 98). Ce dispositif est une pièce monobloc, imprimée en 3D par la méthode de jet d'encre. Lorsque le flux est dans le sens direct de bioimpression, la valve est ouverte, mais si le flux remonte dans le système, la valve se ferme, bloquant ainsi les retours de bioencre à l'intérieur des seringues d'impression.

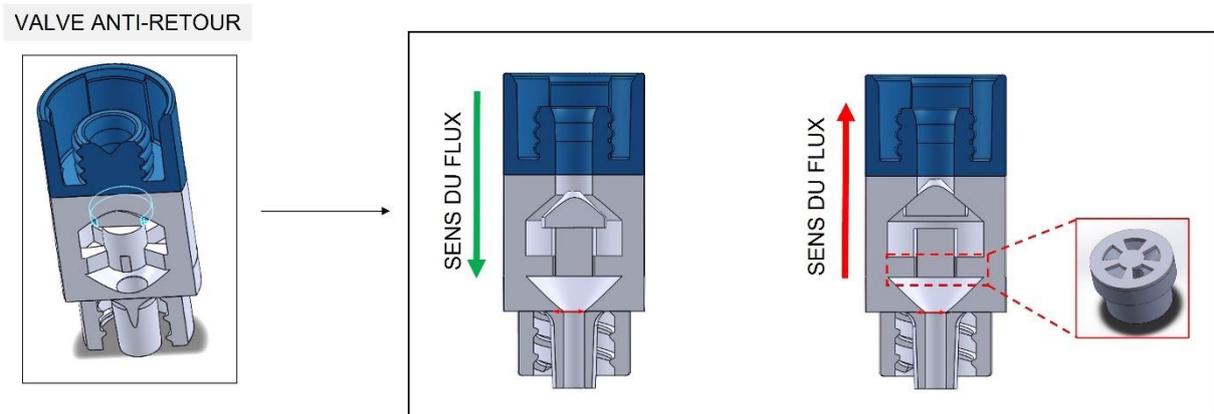


Figure 98 Fichier CAO d'un système de valve anti-retour, imprimé 3D, pour le prototype v3.

Nous avons aussi modifié la forme du prototype v2, permettant de l'alléger et de gagner en temps d'impression 3D lors de sa fabrication, grâce à la réduction de matière de résine acrylate utilisée autour des zones de fixation des seringues (Figure 99).

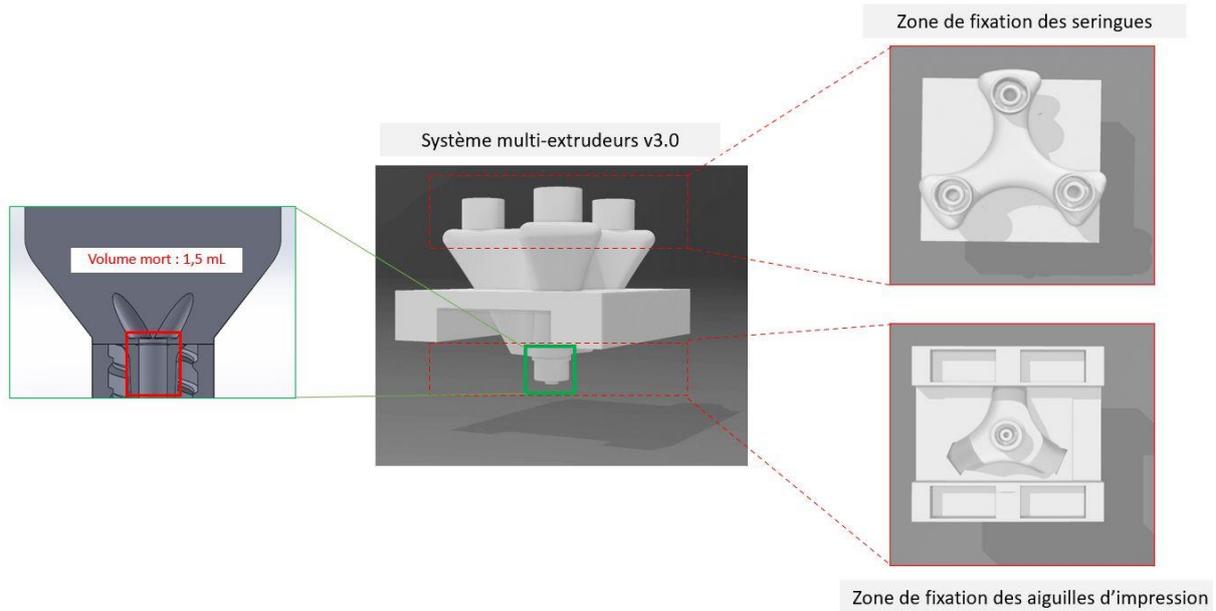


Figure 99 Fichier CAO du prototype V3 du système d’extrusion multi-extrudeurs avec ses améliorations. Passage à une seule sortie pour fixer une seule aiguille d’impression. Un volume mort de 1,5 a été mesuré à l’intérieur de la structure.

Limites et solutions

La limitation principale rencontrée lors de l’utilisation du prototype v3 est le volume mort conséquent, créé à l’intérieur du dispositif d’extrusion. En effet, ce volume mort de 1,5 mL est très conséquent par rapport à la quantité de bioencres utilisée lors d’une seule impression et doit ainsi être optimisée (Tableau 22).

Tableau 22 Résumé de la limitation rencontrée lors de l'utilisation du prototype v3 ainsi que la solution à apporter.

LIMITATION RENCONTREE	SOLUTION A APPORTER
Volume mort important du support d’extrusion	Réduction de la taille du dispositif

iv. Prototype v4

Etude de faisabilité

Le prototype v4 est une optimisation morphologique du prototype précédent. Nous avons constaté la création d'un volume mort important à l'intérieur de la structure dû au temps de séjour long entre l'entrée de la bioencre et la sortie jusqu'à l'aiguille d'impression. En effet, ce phénomène est une limitation importante puisqu'un grand volume de bioencre est perdu lors de la biofabrication d'un seul objet. La partie supérieure du support a ainsi été réduite au maximum avec un volume mort initiale de 1,5 mL que nous avons pu optimiser à 0,5 mL (Figure 100).

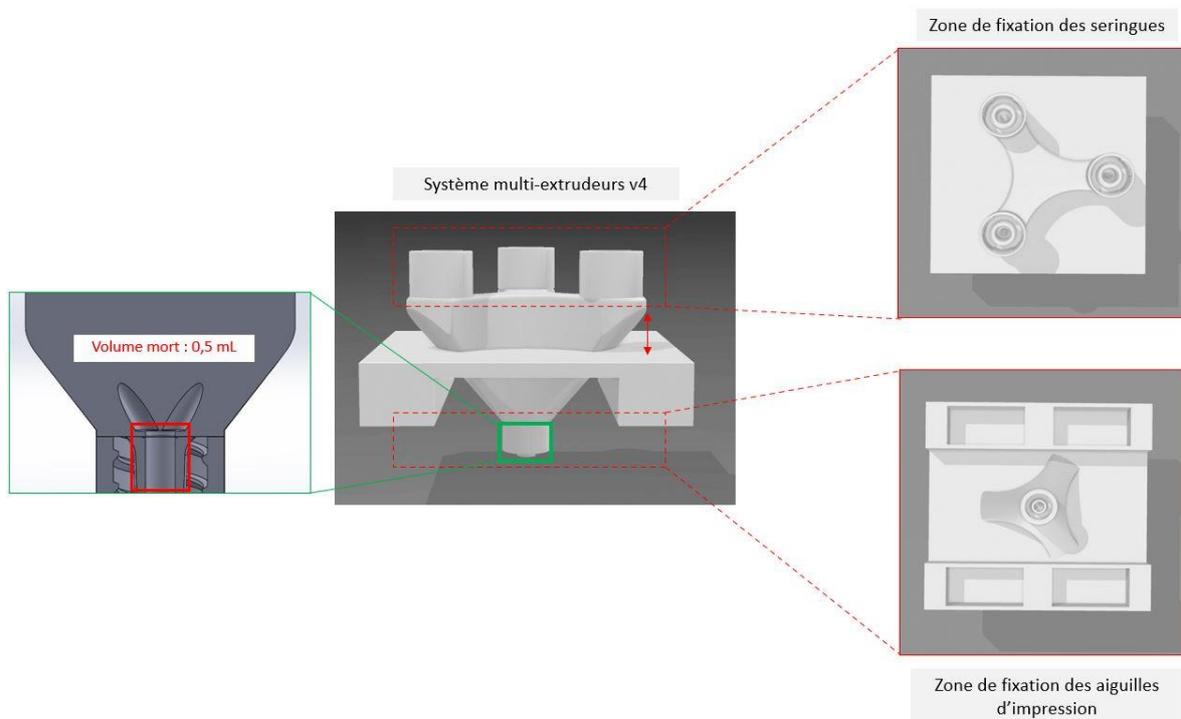


Figure 100 Fichier CAO du prototype v4 du système de bioimpression multi-extrudeurs. Optimisation de la forme générale du système et réduction du volume mort à 0,5 mL de bioencre.

Grâce à ce prototype v4, des structures tubulaires multicouches ont pu être bioimprimées en une seule étape de bioimpression (Figure 101).

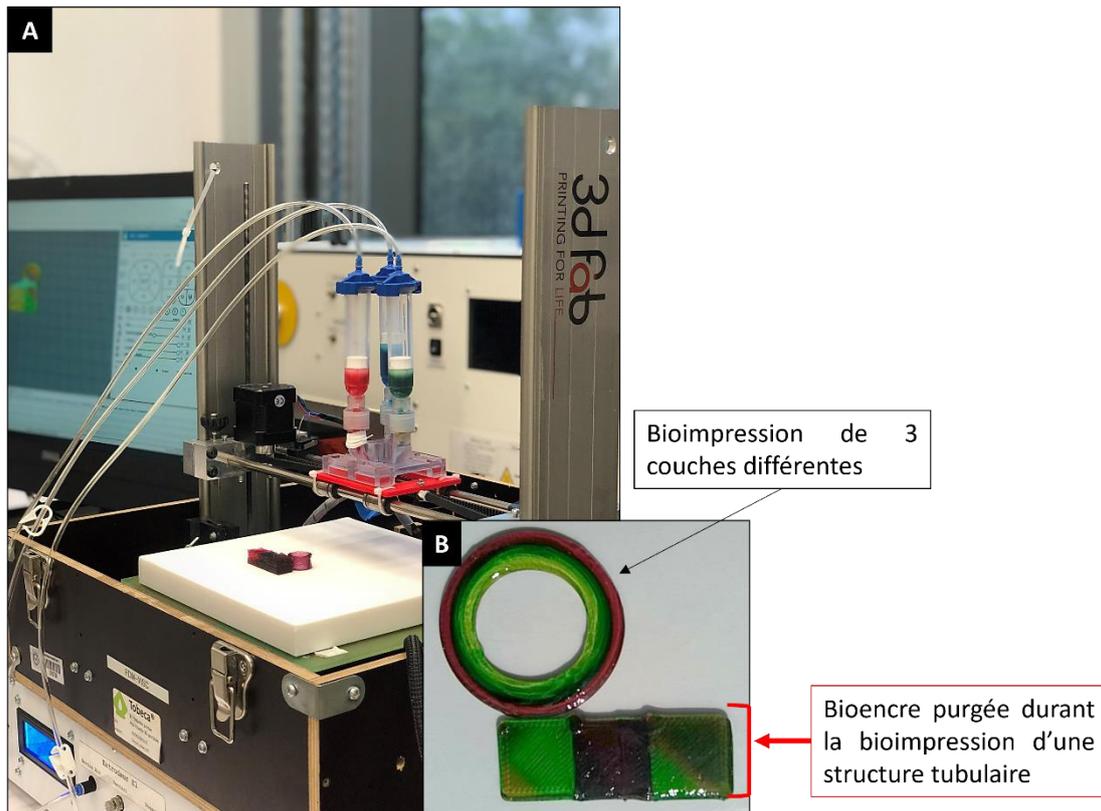


Figure 101 (A) Image du processus de bioimpression 3D par extrusion pneumatique multi-extrudeurs. **(B)** Structure tubulaire multicouche bioimprimée en une seule étape et composée de trois bioencres différentes (rouge, bleu foncée et verte). Des cubes représentant la purge des bioencres réalisée entre chaque changement de seringue sont aussi imagés.

Limites et solutions

La limitation de ce système de microextrusion multi-extrudeurs est la présence d'un volume de purge nécessaire, très conséquent malgré l'optimisation du dernier prototype. En effet pour 10 mL de bioencre préparée pour 1 seringue d'impression, 2 mL servent pour bioimprimer une couche de la structure tubulaire, contre 8 mL servant à la purge (Figure 101). Cependant, cette étape reste nécessaire pour ce système multi-extrudeur à chaque changement de bioencre, évitant ainsi le mélange des composants cellulaires.

La conception et l'utilisation de ce dispositif à l'heure actuelle n'est pas optimal pour le développement et l'étude de structures vasculaires multicouches et cellularisées, mais il reste optimisable pour les futures recherches.

Les paramètres clés du cahier des charge auxquels répond l'approche de bioimpression par microextrusion à multi-extrudeurs, sont identifiés dans la Figure 102.

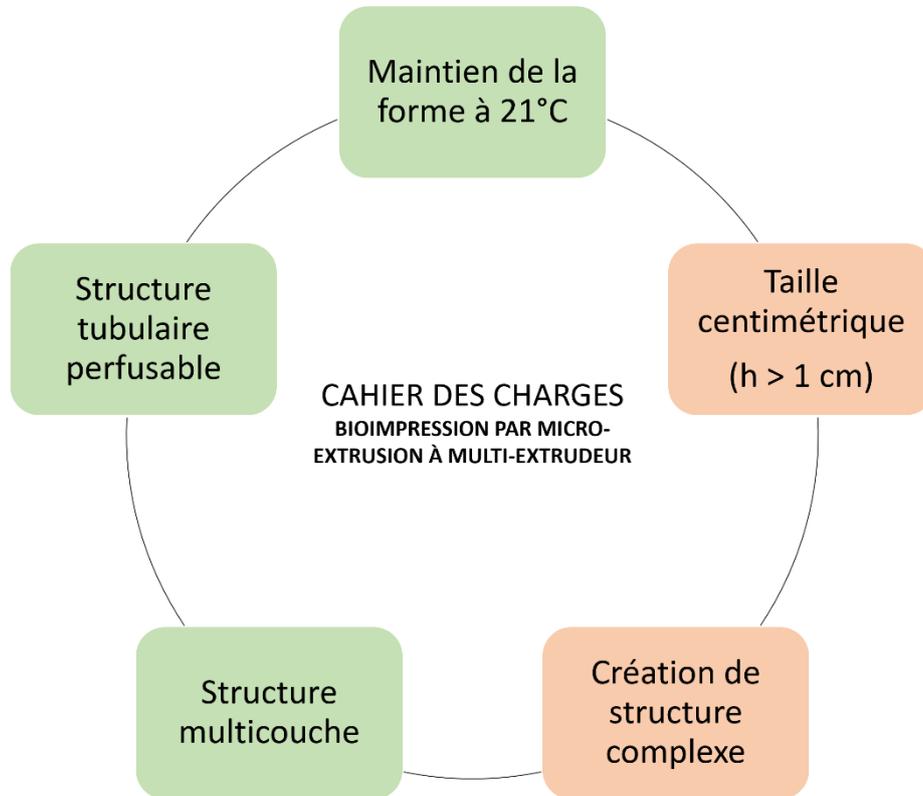


Figure 102 Paramètres du cahier des charges auxquels répond (vert) ou ne répond pas (rouge) ou possibles mais optimisables (orange), la bioimpression par microextrusion à multi-extrudeurs.

III.1.9. Conclusions

Durant cette étude nous avons pu présenter les avantages et les limitations rencontrées par diverses méthodes de bioimpression, permettant ou non de répondre à un cahier des charges complexe de développement d'une structure de taille centimétrique, tubulaire et multicouche, mimant morphologiquement un vaisseau sanguin natif.

Cette première approche d'ingénierie vasculaire s'est focalisée uniquement sur le développement et l'optimisation d'outils permettant de bioimprimer de manière la plus pertinente possible, une structure tubulaire multicouche, à partir de la bioencre que nous avons formulée et décrite dans le Chapitre III.

L'étude suivante se focalise, quant à elle, sur les outils de biofabrications permettant la création d'une structure 3D composée de trois couches cellulaires différentes, mimant ainsi la paroi vasculaire.

III.2. La biofabrication plane

Pour cette étude des structures mimant la composition de la paroi vasculaire, les technologies permettant de reproduire une forme tubulaire ne sont pas nécessaires et n'ont pas été utilisées. En effet, les études biologiques que nous avons menées sur la biofabrication d'un tissu vasculaire, qui seront décrites dans le Chapitre V, se focalisent sur le comportement des cellules à l'intérieur et à travers les différentes couches, reproduites par bioimpression 3D.

III.2.1. Le cahier des charges

L'approche de biofabrication d'une structure plane multicouche nécessite de respecter le cahier des charges présenté sur la Figure 103 suivante :

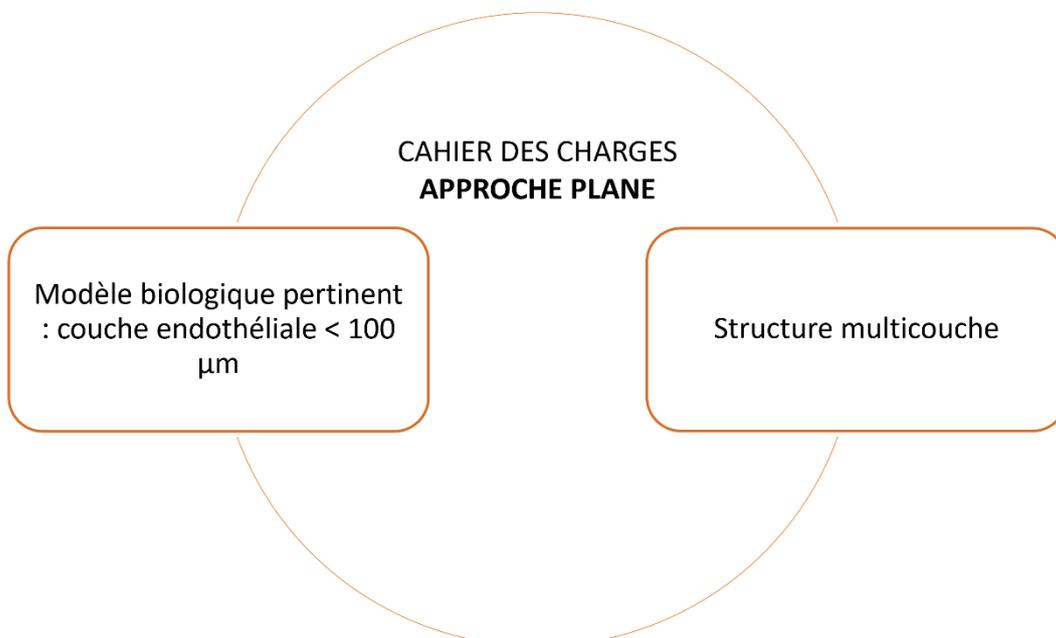


Figure 103 Cahier des charges présentant les paramètres clés permettant de biofabriquer un modèle de structure vasculaire par une approche plane.

III.2.2. La bioimpression 3D par microextrusion

La méthode que nous avons utilisé pour la biofabrication de structures planes multicouches est la bioimpression par microextrusion à 1 extrudeur. En effet, malgré le fait que différentes couches cellularisées doivent être bioimprimées, l'utilisation du système multi-extrudeur (avec le processus de purge non optimisé) n'était pas pertinente pour cette étude qui nécessite de grande quantité d'objets bioimprimés.

i. Etude de faisabilité

Trois bioencres de composition en biomatériaux identique (gélatine, alginate et fibrinogène) et ensemencées, de fibroblastes, d'HUVEC ou de CMLV, ont été formulées. Chacune des trois couches étant bioimprimées successivement grâce au changement de seringues manuel.

Une quantité totale de 2 mL de bioencre pour chacun des trois types cellulaires est préparée et permettent la bioimpression de 40 objets de tailles identiques : 10 mm (L) x 10 mm (l) x 1,2 mm (h). L'épaisseur définit de 1,2 mm représente une épaisseur de 400 μ m chacune des trois couches cellulaires bioimprimées. (Figure 104).

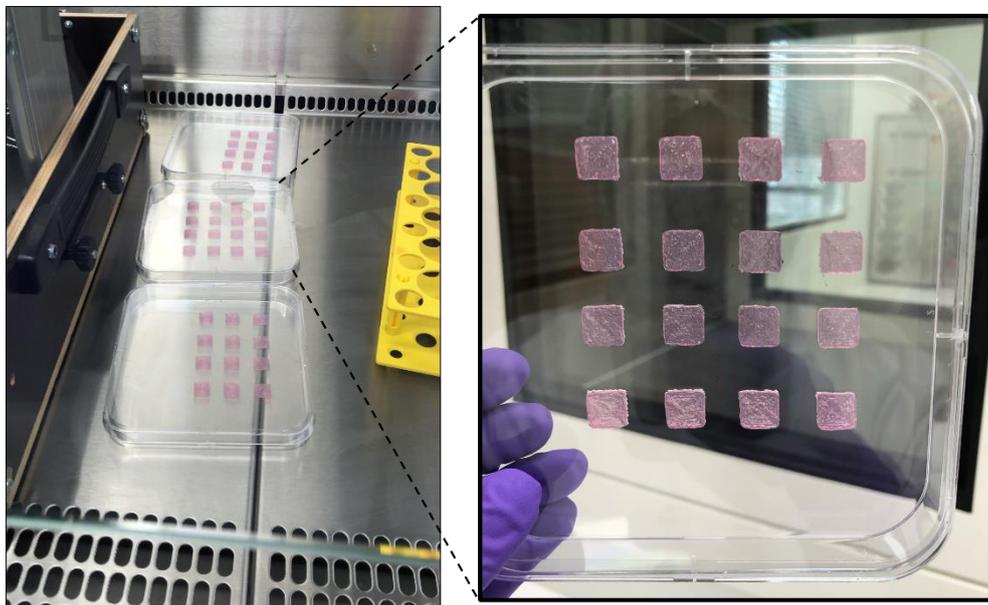


Figure 104 Structures bioimprimées planes de 10 mm x 10 mm x 1,2 mm et composées de trois couches cellulaires différentes de 400 μ m chacune, les unes sur les autres. Technique de bioimpression par extrusion permettant une grande reproductibilité des modèles bioimprimés.

ii. Limites et solutions

Ce procédé de fabrication facilement mis en œuvre, possède une seule limitation. En effet, pour se rapprocher au plus près de la physiologie d'une paroi vasculaire, une couche unique de cellules endothéliales doit être développée au sein de la structure bioimprimée (Tableau 23). Cependant, chacune des couches, y compris celle composée de cellules endothéliales, mesure 400 µm d'épaisseur. Cette épaisseur de couche est trop importante et ne permet pas le développement d'une seule couche de cellules endothéliales, mimant un endothélium vasculaire.

Tableau 23 Résumé de la limitation rencontrée lors de l'utilisation de la bioimpression 3D par microextrusion pour le développement d'une structure multicouche plane, mimant la paroi vasculaire, ainsi que la solution à apporter.

LIMITATION RENCONTREE	SOLUTION A APPORTER
Epaisseur de la couche endothéliale trop importante (400 µm)	Méthode de formation d'une couche plus fine, par diffusion enzymatique

La bioimpression 3D par microextrusion ne permet pas de créer des couches d'épaisseur inférieure à 200 µm. En effet, l'utilisation d'une aiguille de 200 µm entraîne des contraintes de cisaillement trop importantes pour permettre un maintien de la viabilité cellulaire durant la bioimpression⁴³³. Une autre méthode permettant d'organiser les cellules endothéliales dans une couche d'hydrogel 3D d'épaisseur inférieure à 400 µm est alors nécessaire.

Les paramètres clés du cahier des charge auxquels répond l'approche de bioimpression par microextrusion, sont identifiés dans la Figure 105.

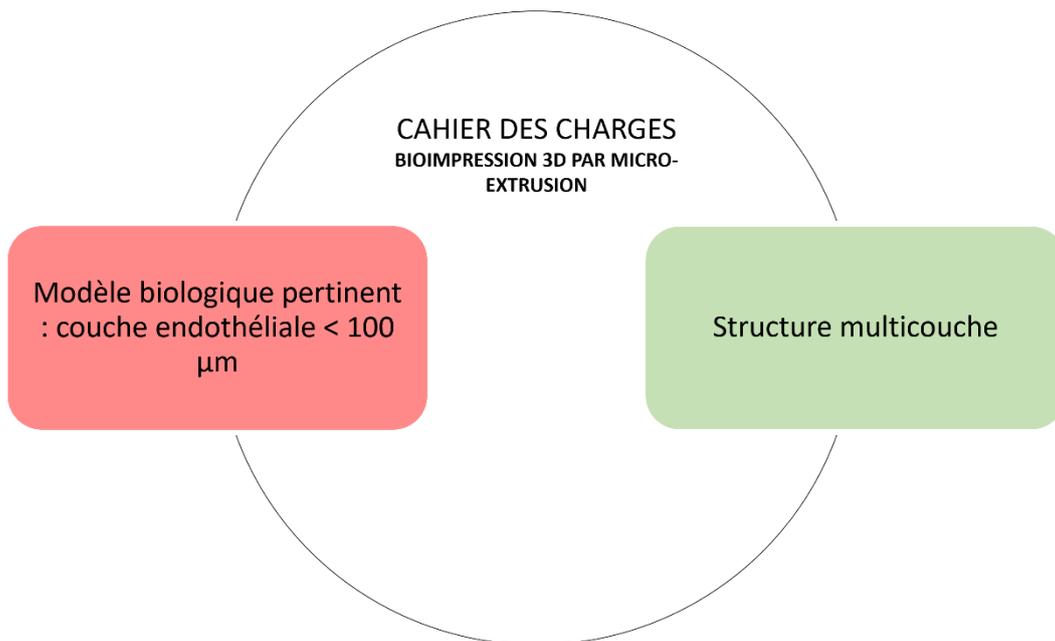


Figure 105 Paramètres du cahier des charges auxquels répond (vert) et ne répond pas (rouge) la bioimpression par microextrusion à 1 extrudeur.

En se basant sur les résultats obtenus lors de la fabrication par impression 4D d'une structure tubulaire en fibrine grâce à la diffusion de la thrombine de l'hydrogel de PEG700 jusqu'à la solution de fibrinogène, nous allons présenter dans l'étude suivante une méthode de bioimpression 4D permettant de former une couche endothéliale fine d'environ 100 μm d'épaisseur.

III.2.3. La bioimpression 4D

Cette méthode repose sur l'utilisation de la bioimpression 3D par microextrusion standard couplée à une modification de composition des bioencres de telle sorte qu'une réaction 4D enzymatique se produise à l'intérieur de l'objet, après bioimpression 3D.

Cette approche va nous permettre de créer trois couches cellularisées différentes, dont une couche contenant les cellules endothéliales, d'épaisseur fine de 100 μm, permettant de mieux refléter l'endothélium des vaisseaux sanguins.

i. Etude de faisabilité

La bioimpression 4D d'une structure multicouche plane s'effectue en 4 étapes que nous avons résumé sur la Figure 106 :

1. La bioimpression de la 1^{ère} couche vasculaire composée de fibroblastes ensemencés dans une bioencres d'alginate, de gélatine et de fibrinogène. Cette composition correspond à la formulation standard de la bioencres que nous avons développé.
2. La bioimpression de la 2^{ème} couche vasculaire composée de cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV) ensemencées dans une bioencres d'alginate et de gélatine additionnée de thrombine. Ici, la thrombine va permettre de réaliser la réaction 4D en diffusant jusqu'à la solution de fibrinogène se trouvant au dessus.
3. L'ensemencement d'une solution de fibrinogène avec des HUVEC sur la 2^{ème} couche bioimprimées contenant les CMLV et la thrombine.
4. La réaction 4D initiée grâce à la diffusion de la thrombine vers le fibrinogène pour former un réseau de fibrine emprisonnant les HUVEC et correspondant à la 3^{ème} couche vasculaire.

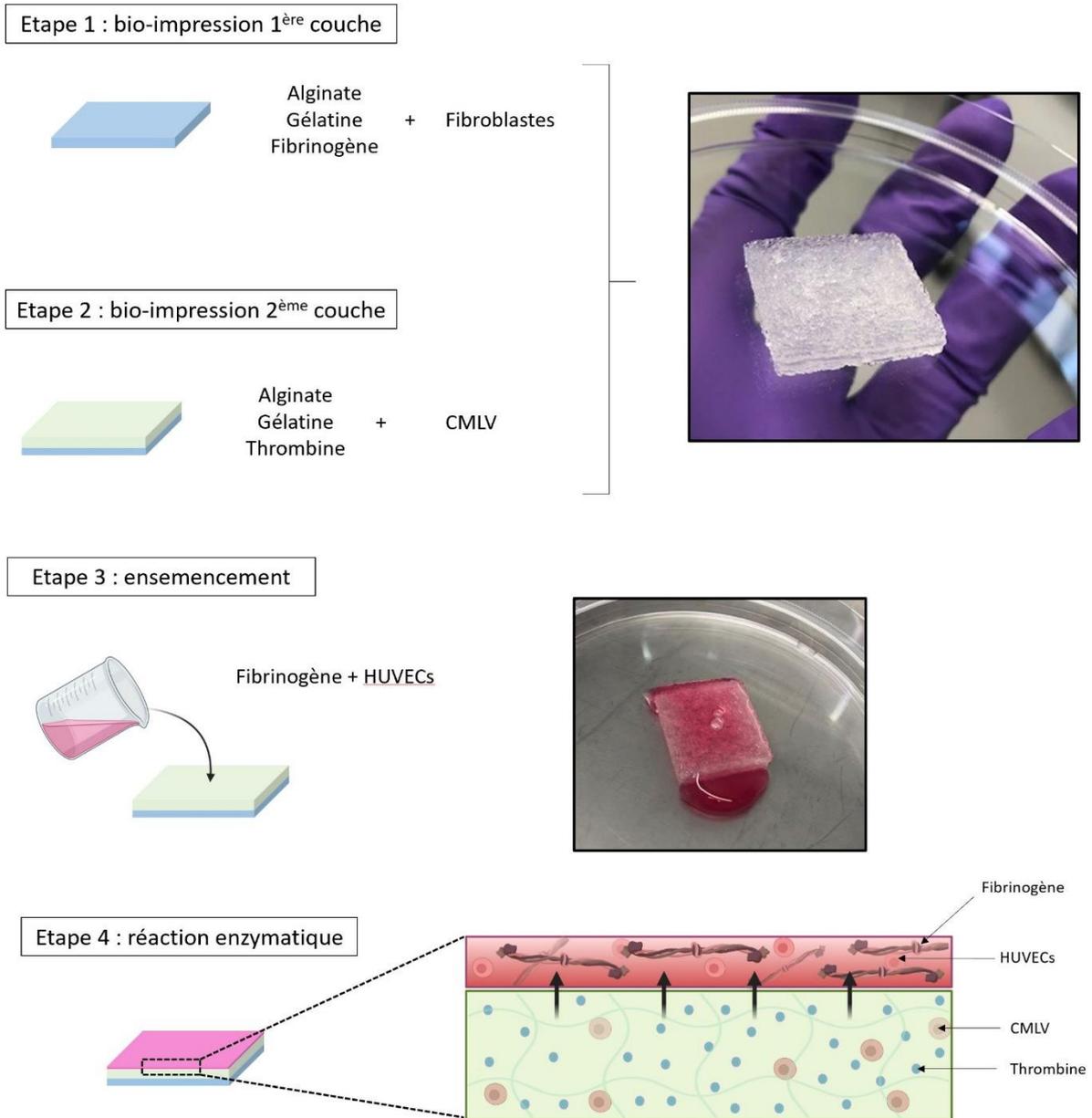


Figure 106 Principe de la bioimpression 4D. L'étape 1 permet la bioimpression de la 1^{ère} couche composée des fibroblastes. L'étape 2 permet la bioimpression de la 2^{ème} couche composée des CMV et de la thrombine. L'étape 3 correspond à l'ensemencement des HUVEC dans une solution de fibrinogène 2 % (m/v) sur la structure bioimprimée. Une réaction enzymatique entre le fibrinogène ensemené et la thrombine située dans la couche inférieure se produit alors, c'est le phénomène 4D (étape 4).

La réaction 4D s'effectue à 21°C pendant 1h. L'objet est ensuite rincé par du PBS pour éliminer le surplus de fibrinogène qui n'aurait pas réagi au contact de la thrombine et permettre enfin la consolidation de la totalité de l'objet à l'aide d'une solution de CaCl₂. Une couche de fibrine d'épaisseur environ 100 µm, emprisonnant les HUVEC, s'est formée grâce à la réaction entre la thrombine et le fibrinogène. En effet, la thrombine possède un poids moléculaire de 34 kDa

alors que le fibrinogène possède un poids moléculaire de 340 kDa. De part leur poids moléculaire élevé, les molécules de fibrinogène vont difficilement diffuser à l'intérieur de la bioencore et vont donc rester préférentiellement à la surface de l'objet. Au contraire, la thrombine, de poids moléculaire beaucoup plus faible, va pouvoir diffuser jusqu'aux molécules de fibrinogène présentes en surface et permettre leurs clivages en monomères de fibrine qui vont ensuite s'assembler pour former un réseau de fibrine insoluble. Ainsi, nous obtenons une couche distincte de fibrine, à la surface de l'objet, emprisonnant les HUVEC et mimant l'endothélium vasculaire (Figure 107).

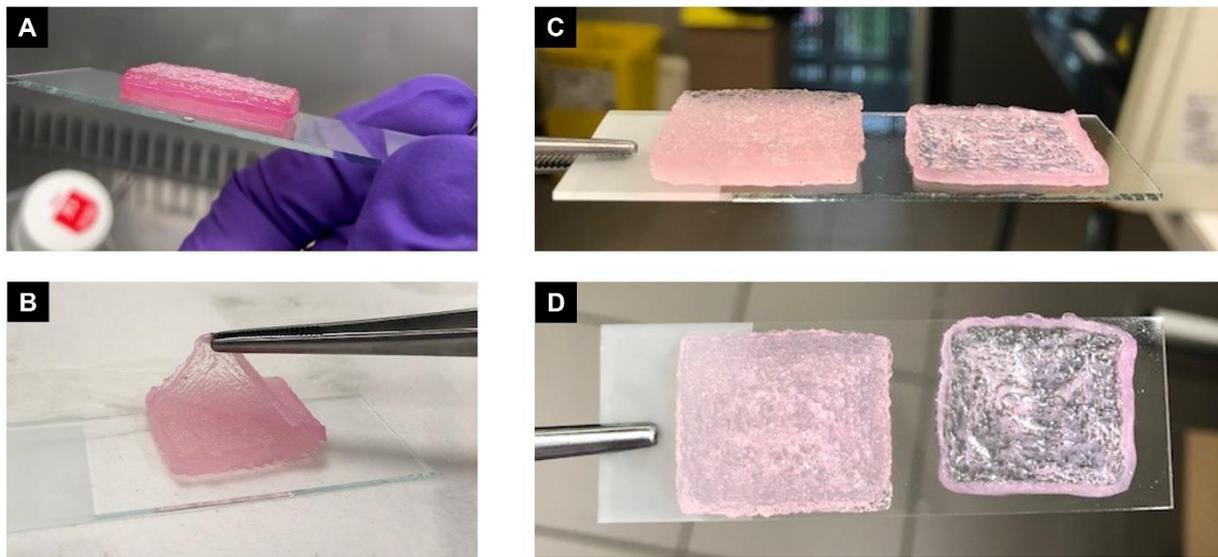


Figure 107 Structure vasculaire plane 4D bioimprimée. (A) Structure après réaction 4D, (B) décollage de la couche de fibrine créée, (C) vue de profil de la couche de fibrine et (D) vue de haut de la couche de fibrine.

Cette dernière méthode de bioimpression 4D nous a permis de créer une structure composée des trois couches cellularisées distinctes. L'atout principal de cette méthode est la formation possible d'une couche d'épaisseur de l'ordre de 100 μm , emprisonnant les cellules endothéliales, mimant ainsi au mieux l'endothélium vasculaire.

ii. Limites et solutions

Cependant, plusieurs limitations ont été identifiées lors de l'utilisation de la bioimpression 4D d'une structure multicouche et sont résumées dans le Tableau 23. En effet, l'utilisation de la réaction 4D entraîne un changement de composition de la couche centrale de l'objet avec le remplacement du fibrinogène par la thrombine. Les cellules musculaires lisses vasculaires se

retrouvent alors dans un nouvel environnement 3D, non caractérisé pour l’instant dans ces travaux de thèse, mais pouvant impacter le développement cellulaire. De plus, une caractérisation de la localisation cellulaire est à effectuer. En effet, les cellules peuvent migrer à travers les différentes couches de l’objet et entraîner une homogénéisation de celui-ci, devenant ainsi un objet monocouche avec les fibroblastes, les CMLV et les HUVEC dans le même environnement 3D. Enfin, les HUVEC se trouvent dans un environnement formé d’un seul biomatériau, la fibrine, pouvant aussi avoir un impact sur le développement cellulaire. Une caractérisation de l’organisation de cellules dans la fibrine par rapport à celle dans la bioencore que nous avons développée (alginate, gélatine, fibrinogène), sera donc nécessaire.

Tableau 24 Résumé des limitations rencontrées durant l’utilisation de la bioimpression 4D pour biofabriquer une structure multicouche plane ainsi que les solutions à apporter.

LIMITATIONS RENCONTREES	SOLUTIONS A APPORTER
Modification de la composition en biomatériaux de la bioencore des CMLV	Caractériser l’impact de ce changement
Migration cellulaire possible	Caractériser la localisation des cellules en fonction du temps de culture
Les HUVEC se trouvent dans un environnement composé uniquement de fibrine	Caractériser l’effet de cet hydrogel mono-biomatériau sur le développement et l’organisation des HUVEC par rapport à notre bioencore

Les paramètres clés du cahier des charges auxquels répond l’approche de bioimpression 4D, sont identifiés dans la Figure 108.

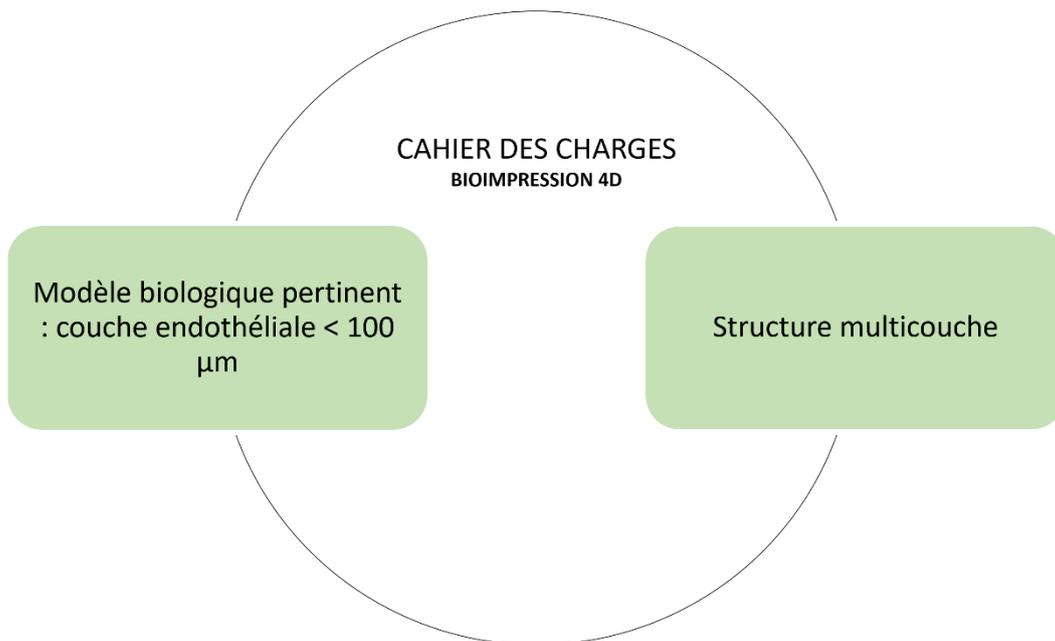


Figure 108 Paramètres du cahier des charges auxquels répond (vert) et ne répond pas (rouge) la bioimpression 4D.

III.2.4. Conclusions

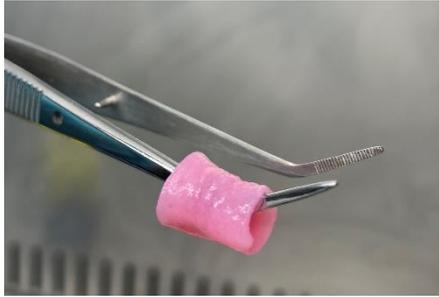
Durant cette étude présentant l'approche de biofabrication plane, nous avons pu mettre en avant deux méthodes permettant de développer une structure multicouche mimant la paroi vasculaire. Les avantages et les limitations de ces deux approches ont été expliquées pour permettre de répondre au cahier des charges établi. En effet, l'enjeu principal étant de recréer les trois couches vasculaires avec un focus particulier sur la couche de cellules endothéliales devant permettre leur auto-assemblage en une unique couche, mimant ainsi un endothélium vasculaire.

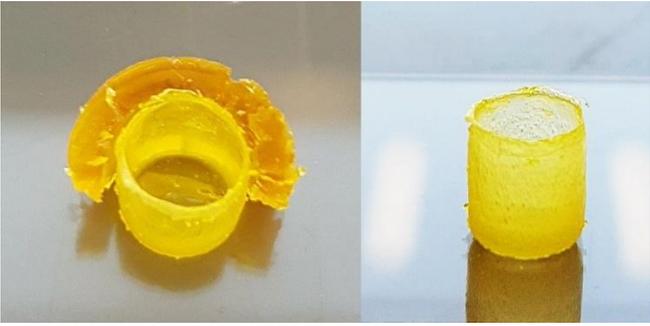
La biofabrication d'une structure multicouche par une approche plane nous a permis d'utiliser des outils de biofabrication facile à mettre en œuvre. La bioimpression par microextrusion à 1 extrudeur a été utilisée et a répondu au besoin d'utilisation de trois bioencres cellularisées différentes.

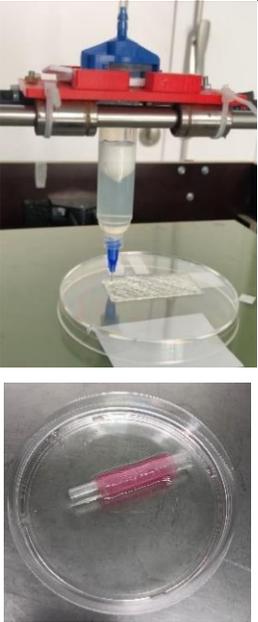
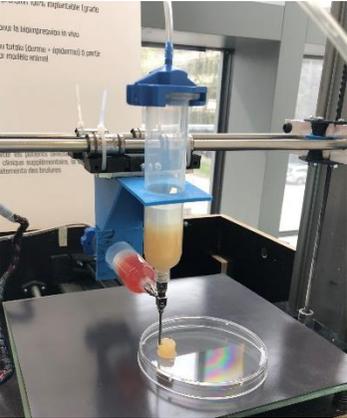
L'organisation spatiale et précise des cellules dans l'objet est réalisée durant la bioimpression, cependant cette organisation doit être caractérisée à plus long terme, avec notamment une caractérisation des phénomènes de migration cellulaire inter-couche à travers les pores de l'hydrogel.

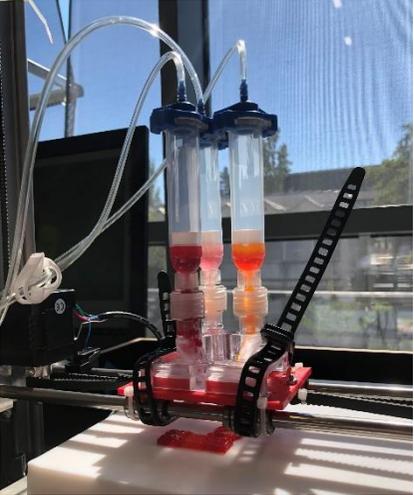
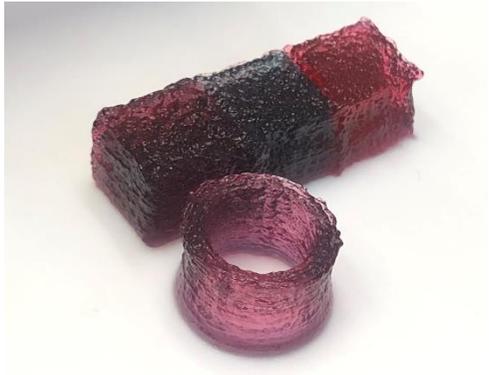
IV. Tableau récapitulatif des différentes techniques

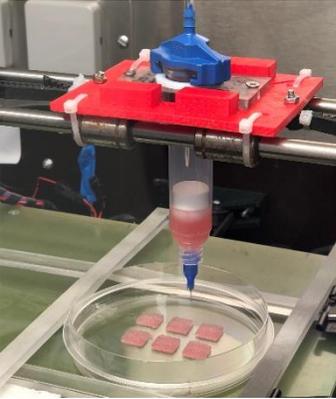
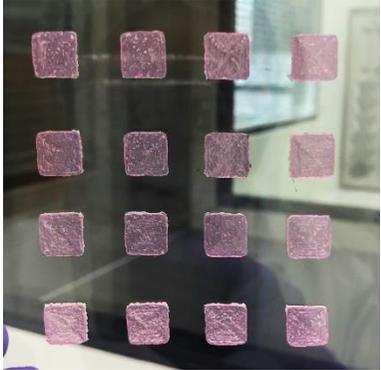
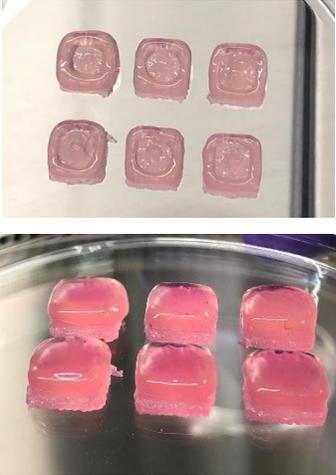
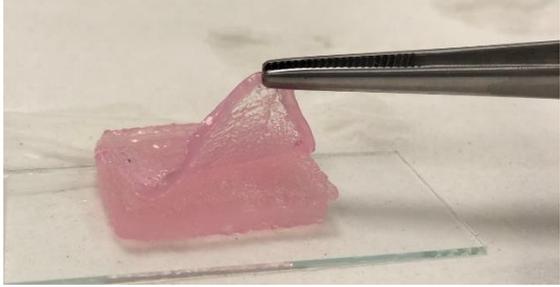
Tableau 25 Tableau récapitulatif des différentes techniques développées et utilisées durant ce projet. Ces techniques diffèrent en fonction de leurs applications : la méthode directe permet le développement de techniques de grande complexité pour créer des tissus vasculaires d'échelle centimétrique, et la méthode indirecte a pour but de se focaliser sur les interactions cellulaires à l'intérieur du tissu, en s'affranchissant de la complexité de fabrication.

	TECHNIQUE DE BIOFABRICATION	PHOTO DE LA TECHNIQUE DE BIOFABRICATION	CARACTERISTIQUES PRINCIPALES	LIMITATIONS	RESULTATS	RESOLUTION
APPROCHE BIOFABRICATION TUBULAIRE	Bioimpression par micro-extrusion à 1 extrudeur (p.206)		Mise en œuvre simple	<ul style="list-style-type: none"> - Impossibilité de fabriquer une structure tubulaire et multicouches en une étape - Faible résolution du tube finale - Peu reproductible - Hauteur maximale en Z limitée à 2 cm 	<p>Structure tubulaire monocouche</p> 	<p>Résolution de surface : 200 μm</p> <p>Résolution du filament : 400 μm</p>

<p>Impression 4D (p.209)</p>		<ul style="list-style-type: none"> -Technique DLP (stéréolithographie) - Haute résolution - Capacité d'impression de structures très complexes 	<p>Impossibilité de mettre des cellules dans l'hydrogel en cours d'impression</p>	<p>Structure tubulaire à 2 couches</p> 	<p>Résolution 3D (hydrogel PEG700DA) : 50 µm</p> <p>Résolution 4D (fibrine) : 50 µm</p>
<p>Bioimpression dans un milieu contraint (p.216)</p>		<ul style="list-style-type: none"> - Utilisation d'1 bioencres - Permet le maintien de l'objet tout au long de la bioimpression 	<p>Impossibilité de fabriquer une structure tubulaire possédant plus d'une couche</p>	<p>Structure tubulaire à 1 couche</p> 	<p>Résolution du filament : 400 µm</p> <p>Résolution de Surface : 200 µm</p>

<p>Bioimpression puis enroulement (p.220)</p>		<ul style="list-style-type: none"> - Utilisation d'une bioencres à la fois - Impression successive des trois couches vasculaires les unes sur les autres 	<p>Procédé manuel augmentant les risques de contamination et de dégradation du tissu</p>	<p>Structure tubulaire bonne résolution à 3 couches</p> 	<p>Résolution de filament : 400 μm</p> <p>Résolution de surface : 200 μm</p>
<p>Bioimpression coaxiale (p.223)</p>		<p>Permet d'utiliser deux bioencres différentes en même temps</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Faible résolution - Hauteur en Z limitée à 1 cm - Pas réellement 2 couches distinctes mais plutôt 1 bioencres enrobée dans l'autre 	<p>Structure tubulaire faible résolution à 1 couche</p> 	<p>Résolution du filament : 1,6 mm</p> <p>Résolution de surface : 800 μm</p>

<p>Bioimpression triaxiale (p.228)</p>		<ul style="list-style-type: none"> - Permet d'utiliser trois bioencres différentes en même temps - Utilisation de l'aiguille triaxiale pour former la structure tubulaire multicouches directement <i>via</i> l'extrusion - Haute résolution 	<p>Morphologie structurale limitée à celle de la buse (nombre et épaisseur de couches)</p>	<p>Structure tubulaire haute résolution à 2 couches</p> 	<p>/</p>
<p>Bioimpression par micro-extrusion multi-extrudeurs (p.232)</p>		<ul style="list-style-type: none"> - Utilisation de 3 bioencres différentes en même temps - Possibilité de fabrication d'un large éventail de structures 	<p>Volume mort élevé (8mL perdu pour 2mL imprimé)</p>	<p>Structure tubulaire bonne résolution à 3 couches</p> 	<p>Résolution de filament : 400 μm</p> <p>Résolution de surface : 200 μm</p>

APPROCHE DE BIOFABRICATION PLANE	Bioimpression par micro-extrusion (p.243)		<ul style="list-style-type: none"> - Utilisation de 3 bioencres - Bioimpression des différentes couches successivement les unes sur les autres 	Couche endothéliale trop épaisse	<p>Structure non tubulaire à 3 couches</p> 	<p>Résolution de filament : 400 μm</p> <p>Résolution de surface : 200 μm</p>
	Bioimpression 4D (p.245)		<ul style="list-style-type: none"> -Utilisation de 2 bioencres différentes de manière successive - Création de la couche endothéliale par réaction enzymatique entre le fibrinogène et la thrombine - Couche endothéliale d'épaisseur < 100 μm 	/	<p>Structure non tubulaire à 3 couches</p> 	<p>Résolution de filament : 400 μm</p> <p>Résolution de surface : 200 μm</p> <p>Résolution 4D : 50 μm</p>

V. Conclusions et perspectives

Dans ce chapitre nous avons évalué une large gamme de techniques de biofabrication que nous avons mises en place durant ces travaux de thèse afin de construire une structure vasculaire. Pour répondre à cet enjeu, deux grandes stratégies au cahier des charges différent, ont été adoptées : une approche de biofabrication tubulaire et une approche de biofabrication plane.

La méthode de biofabrication tubulaire repose sur un cahier des charges précis répondant à des paramètres clés permettant de développer un objet vasculaire, multicouche, de taille centimétrique et tubulaire. Pour cela, nous avons fait évoluer ce cahier des charges en partant de la bioimpression 3D par microextrusion standard dont est équipée notre bioimprimante 3D. Cette méthode, utilisant un seul extrudeur, limite la complexité des structures vasculaires obtenues. La technologie d'impression 4D grâce à une imprimante utilisant la technologie de photopolymérisation d'une encre par traitement numérique de la lumière, a par la suite démontré des capacités de formation d'un hydrogel 3D servant de couche intermédiaire de diffusion enzymatique pour la formation d'une structure tubulaire d'épaisseur très fine, inférieure à 200 μm , et de morphologie adaptable. Cependant cette approche ne nous a pas permis de créer une structure tubulaire multicouche. La bioimpression 3D dans un milieu contraint formé de microparticules de gélatine, permet la fabrication de structures vasculaires de morphologie complexe. En effet, des arbres vasculaires ainsi que des tubes d'épaisseur de paroi de 400 μm et de hauteur pouvant faire plusieurs centimètres, sont réalisables. Cependant, cette méthode permet là encore de développer uniquement une structure tubulaire monocouche. La bioimpression 3D multicouche par enroulement a démontré un avantage dans la facilité de mise en œuvre d'une structure à trois couches et tubulaire. La manipulation de l'objet pour le processus d'enroulement reste un frein. La technologie de bioimpression coaxiale et triaxiale, avec l'utilisation d'une buse permettant de fixer deux ou trois seringues d'impression, permet de former des structures tubulaires multicouche en une seule étape d'impression avec l'extrusion simultanément des différentes bioencres. Le facteur limitant a été ici l'épaisseur des parois et la morphologie de l'objet bioimprimé, régit par la forme de la buse. Enfin, la dernière technologie présentée pour l'approche tubulaire a été la bioimpression 3D par microextrusion à multiextrudeur. Un système permettant d'extruder 3

bioencres différentes à travers une unique aiguille d'impression a été conçu et imprimé en 3D spécialement pour ces travaux de thèse. Ce système permet à trois bioencres cellularisées d'être bioimprimées chacune leur tour pour former les trois différentes couches de la paroi vasculaire. La limitation rencontrée à ce système a été le volume mort conséquent engendré avec pour 10 mL de bioencre préparée, une perte de 8 mL durant un processus nécessaire de purge, pour un volume de seulement 2 mL bioimprimé pour la structure tubulaire.

La méthode de biofabrication plane repose quant à elle sur le développement d'une structure mimant la composition et la morphologie de la paroi vasculaire. En effet, un cahier des charges distinct a été établi pour permettre de bioimprimer la couche de cellules endothéliales, la couche de cellules musculaires lisses vasculaires et la couche de fibroblastes, à l'intérieur d'un même objet 3D. La structure tubulaire n'est pas pertinente pour cette étude qui se focalise principalement sur la méthode de reproduction de la composition de la paroi vasculaire. Un point particulier sur l'épaisseur de la couche endothéliale a été apporté, permettant de se rapprocher au mieux de l'assemblage cellulaire monocouche de l'endothélium vasculaire. Pour mettre en œuvre cette deuxième approche plane, nous avons utilisé uniquement la bioimpression par microextrusion. Une première étude a permis de biofabriquer trois couches cellularisées différentes, chacune d'épaisseur de 400 μm . Le point limitant a été l'épaisseur de couche emprisonnant les HUVEC, de 400 μm et par conséquent trop épaisse pour permettre leur organisation en une unique couche endothéliale. Pour résoudre ce problème, la bioimpression 4D a été utilisée. Grâce à cette approche, la production d'une couche de cellules endothéliales de 100 μm a été possible. Cependant, pour établir cette réaction 4D, une modification de composition de la bioencre a dû être mise en place, ayant un impact supposé sur le développement cellulaire. Enfin, la caractérisation de l'organisation des cellules à l'intérieur de ces trois couches séparées devra être étudié afin d'établir une possible migration cellulaire à l'intérieur de l'objet et donc une homogénéisation de celui-ci.

Nous verrons dans le chapitre suivant l'importance de ces interactions cellulaires au sein de structures obtenues par l'approche plane, ainsi que leur impact sur le développement d'un tissu vasculaire.

CHAPITRE V : BIOFABRICATION *IN VITRO* D'UN TISSU MICROVASCULARISÉ

Les chapitres précédents ont présenté le développement d'une bioencore et d'une solution de consolidation aux propriétés augmentées permettant un développement cellulaire rapide à l'intérieur d'un hydrogel bioimprimé. Deux approches ont ensuite été étudiées pour la biofabrication d'un tissu macrovasculaire : l'approche tubulaire et l'approche plane. Grâce à cette dernière technique de biofabrication, nous allons présenter durant ce chapitre, le développement d'un tissu vascularisé par bioimpression 3D, caractérisé par une matrice extracellulaire néosynthétisée par les fibroblastes ainsi que par la mise en place d'une microvascularisation grâce à l'auto-organisation des cellules endothéliales. Le rôle des interactions et des communications cellulaires à l'intérieur de l'hydrogel bioimprimé seront ainsi détaillés.

I. Contexte et objectifs

Il existe différents niveaux de vascularisation nécessaires en ingénierie tissulaire : la macrovascularisation et la microvascularisation. La macrovascularisation peut être obtenue de manière *in vitro* grâce aux différentes techniques que nous avons développées et décrites dans le chapitre IV via l'approche « tubulaire ». Ces méthodes se focalisent principalement sur les méthodes de bioimpression de structures tubulaires multicouches, pouvant refléter au maximum la structure native d'un vaisseau sanguin avec chaque couche composée de son type cellulaire.

De son côté, la microvascularisation est générée *in situ* par un auto-assemblage et un développement de microvaisseaux à partir de cellules endothélialesensemencées dans une bioencore. La difficulté de la microvascularisation réside dans la présence de plusieurs types cellulaires devant réaliser des communications au sein d'un environnement 3D pour réussir à s'auto-assembler en microvaisseaux^{4,28,30,450}.

Au cours de ce chapitre a été étudié l'impact des communications cellulaires à l'intérieur d'un hydrogel bioimprimé. Une comparaison entre les communications établies par les cellules localisées dans différentes couches d'hydrogel avec celles établies par les cellules en co-culture dans le même hydrogel, vont nous apporter des informations importantes.

II. La communication cellulaire : impact sur le développement tissulaire

Afin d'étudier les interactions cellulaires à l'intérieur d'un environnement 3D bioimprimé, nous avons étudié dans un premier temps la communication établit entre les deux principaux types cellulaires composant un tissu vasculaire : les fibroblastes et les cellules endothéliales, ici les HUVEC (*Human Umbilical Vascular Endothelial Cells*). Pour cela nous avons bioimprimé plusieurs objets de taille identique (10 mm x 10 mm x 1,2 mm) intégrant ces différentes cellules, en fonction de l'étude menée (Figure 109). Ces configurations vont nous permettre d'analyser le développement de chacune de ces cellules indépendamment et lorsqu'elles sont en co-culture.

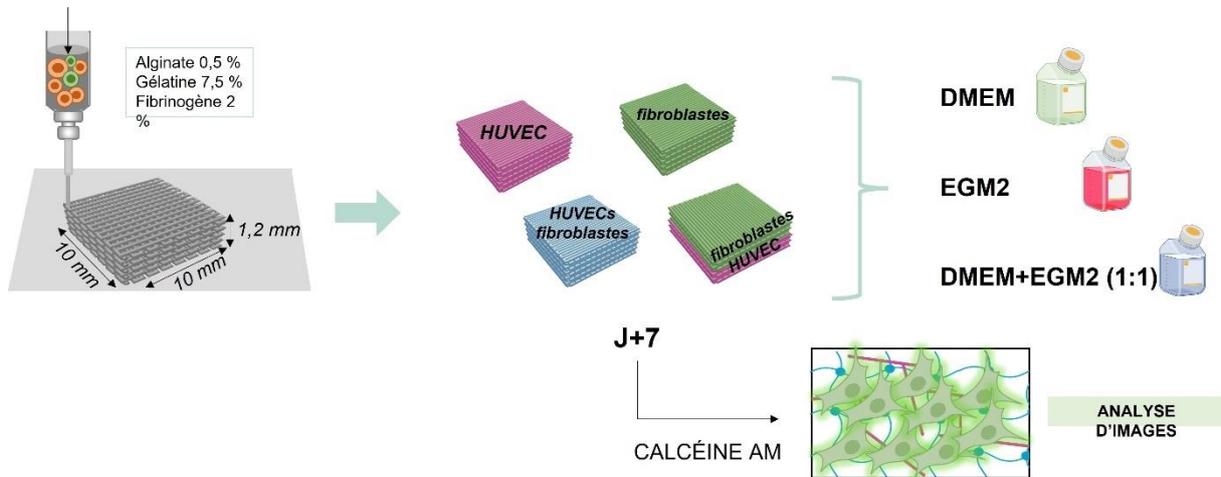


Figure 109 Représentation schématique des différents hydrogels bioimprimés permettant l'étude des communications cellulaires dans un environnement 3D. La composition initiale en biomatériaux est identique pour toutes les configurations (alginate, gélatine, fibrinogène), mais la composition en cellules différente. Après bioimpression, les différents hydrogels sont placés selon trois conditions de culture indépendantes (DMEM, EGM2 ou DMEM/EGM2). Une analyse de développement cellulaire à l'intérieur des hydrogels est ensuite réalisée à J+7 grâce à un marquage par la calcéine AM.

II.1. Fibroblastes seuls dans la bioence

Pour cette première étude nous avons étudié le développement cellulaire des fibroblastes à l'intérieur de notre bioence bioimprimée.

Des fibroblastes ont été mélangés à une concentration de $0,25 \cdot 10^6$ cellules/mL de bioence, dans la bioence constituée de gélatine, d'alginate et de fibrinogène, puis bioimprimés par microextrusion à travers une aiguille de $400 \mu\text{m}$ de diamètre. Enfin, les objets bioimprimés ont été consolidés par une solution de thrombine à une concentration de 10 U/mL et de CaCl_2 à une concentration de $1,45 \text{ mM}$ dans le milieu de culture spécifique des cellules, c'est-à-dire ici le DMEM (+ SVF 10% (v/v), PSF $1X$). Les structures 3D bioimprimées de fibroblastes ont ensuite été placées dans 3 conditions de culture différentes (DMEM ou EGM2 ou DMEM/EGM2) pendant 7 jours et des mesures de suivi de développement cellulaire, grâce à un marquage par la calcéine AM, ont été réalisées (Figure 110).

Lorsqu'ils sont placés en culture dans le DMEM, les fibroblastes bioimprimés dans la bioence présentent un développement cellulaire important à l'intérieur de cet environnement 3D

(Figure 110A). En effet, nous pouvons observer des fibroblastes marqués par la calcéine AM dans la totalité de l'hydrogel 3D. Cependant, lorsque les fibroblastes sont cultivés dans le milieu de culture des cellules endothéliales, l'EGM2, une dégradation de l'hydrogel dans les 12 heures post bioimpression a été observée et de ce aucun développement cellulaire n'a pu être identifié (Figure 110B). Cette dégradation de l'hydrogel pourrait s'expliquer par le fait que les fibroblastes se retrouvent dans un environnement de culture induisant un stress cellulaire et ainsi une dérégulation de l'homéostasie matricielle, empêchant le remodelage tissulaire⁴⁵¹. En effet, les fibroblastes, sont des acteurs clés pour maintenir cette homéostasie cutanée et orchestrer la réparation physiologique d'un tissu. S'ils ne sont pas cultivés dans un environnement propice à ce mécanisme, tout ce système en sera perturbé. Les fibroblastes, en sécrétant des métalloprotéinases matricielles (MMP) et des inhibiteurs tissulaires des métalloprotéinases (TIMP), sont capables de remodeler l'hydrogel bioimprimé en le dégradant pour néosynthétiser leur propre matrice extracellulaire (MEC)⁴⁵²⁻⁴⁵⁴. L'équilibre MMP et TIMP est crucial dans le remodelage tissulaire^{455,456}. Cependant, la sécrétion et l'expression des enzymes d'activation des MMP et des TIMP sont influencées par les cytokines⁴⁵⁷. Ce sont les fibroblastes qui jouent un rôle central dans ce remodelage tissulaire en synthétisant des facteurs de croissance qui vont avoir un impact direct sur la production et l'action des MMP et des TIMP.

De ce fait, lorsqu'ils sont cultivés dans un environnement défavorable induisant un stress cellulaire, les facteurs de croissance nécessaires à cette homéostasie MMP/TIMP ne sont pas synthétisés par les fibroblastes et une dérégulation de la sécrétion de MMP par rapport au temps de remodelage néo-matriciel, est envisagée. Cela entraînerait ainsi une dégradation trop rapide de l'hydrogel et donc une dissolution complète.

Enfin, lorsque les fibroblastes sont cultivés dans un mélange similaire de DMEM et EGM2 ((ratio 1 :1), nous pouvons observer sur la Figure 110c que des fibroblastes sont présents dans l'hydrogel et se développent lentement par rapport à la condition A, uniquement dans le DMEM. La présence du milieu de culture EGM2 semble donc jouer ici aussi un rôle inhibant/limitant le développement des fibroblastes à l'intérieur de l'hydrogel 3D.

Le graphique présent sur la Figure 110b quantifie le développement des fibroblastes lorsqu'ils sont en culture dans le DMEM et dans le mélange DMEM/EGM2. Lors de la culture dans le

DMEM uniquement, nous pouvons constater un développement cellulaire important durant les trois premiers jours de culture puis un maintien de cette densité cellulaire durant les jours de culture suivants. En effet les fibroblastes semblent s'être développées et proliférer dans la totalité de l'hydrogel pour arriver à une densité maximale. Au contraire, dans les conditions de culture DMEM/EGM2, un développement cellulaire significatif est constaté entre le jour 1 et le jour 3 post bioimpression mais aucun développement supplémentaire ne sera observé après 3 jours de culture. Une inhibition de la prolifération des fibroblastes semble donc avoir lieu avec des fibroblastes adoptant un mode de type « quiescent », c'est-à-dire qu'ils maintiennent une viabilité dans la structure 3D mais ne prolifèrent pas.

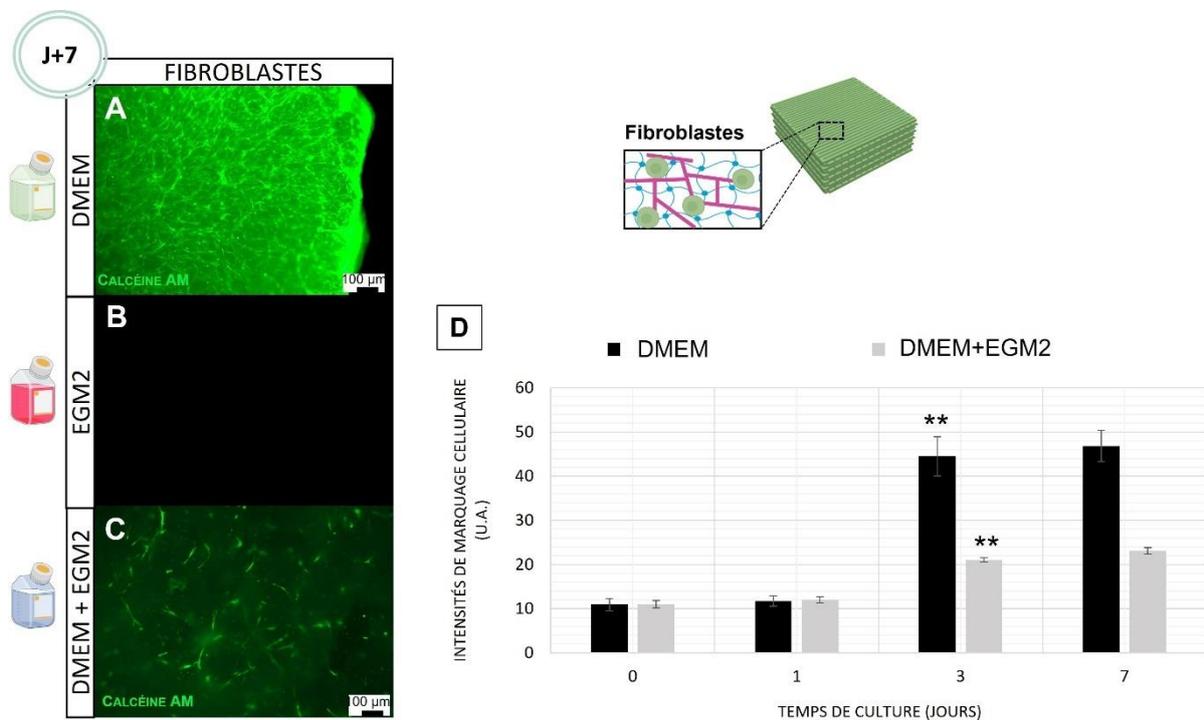


Figure 110 Caractérisation du développement cellulaire des fibroblastes à l'intérieur d'un hydrogel 3D pendant 7 jours de culture. (A) Caractérisation par microscopie de fluorescence des fibroblastes marqués par la calcéine AM après 7 jours de culture dans leur milieu spécifique, le DMEM, (B) dans le milieu de culture des cellules endothéliales, l'EGM2 (C) et dans un mélange des deux milieux de culture DMEM et EGM2 en quantité équivalente. Barre d'échelle 100 µm. (D) Représentation graphique de la prolifération cellulaire des fibroblastes cultivés dans du DMEM et dans le mélange DMEM/EGM2 pendant 7 jours de culture. n = 4, Valeur-p calculée selon le test t de Welch, ** p < 0,01 et ∅ = non significatif.

Pour résumer, les fibroblastes bioimprimés seuls dans la bioencore présentent donc un développement différent en fonction du milieu de culture dans lequel ils sont cultivés. Dans leur milieu de culture spécifique, le DMEM, nous pouvons constater un développement des fibroblastes en 3 jours. Au contraire, lorsque les fibroblastes sont cultivés dans de l'EGM2,

une dérégulation de la synthèse des facteurs de croissance par les fibroblastes semble entraîner une dégradation rapide de l'hydrogel en 12 h post bioimpression. Ce résultat pourrait être validé grâce à l'étude des protéases sécrétées par les fibroblastes dans le surnageant de culture par la méthode de zymographie. Enfin, dans un mélange équivalent de DMEM et d'EGM2, l'hydrogel ne se dégrade pas, cependant les fibroblastes se développent lentement, avec un arrêt de développement après 3 jours de culture post bioimpression.

Cette première étude nous démontre alors l'effet positif de la présence du milieu de culture DMEM pour le développement des fibroblastes à l'intérieur de la bioencore.

II.2. HUVEC seules dans la bioencore

Une étude similaire à celle présentée pour les fibroblastes a été effectuée pour les cellules endothéliales. Pour cela, les HUVEC (*Human Umbilical Vascular Endothelial Cells*) ont été mélangées à une concentration de $1,0 \cdot 10^6$ cellules/mL, à la bioencore composée de gélatine, d'alginate et de fibrinogène, puis bioimprimées par microextrusion à travers une aiguille de 400 μm de diamètre. Enfin, les objets ont été consolidés par une solution de thrombine de concentration 10 U/mL et de CaCl_2 de concentration 1,45 mM dans le milieu de culture spécifique des cellules, c'est-à-dire ici l'EGM2. Les HUVEC bioimprimées ont ensuite été placées en culture dans trois conditions différentes (EGM2 ou DMEM ou DMEM/EGM2) pendant 7 jours et des mesures de suivi de développement cellulaire, grâce à un marquage par la calcéine AM, ont été réalisés (Figure 111 a).

D'après le marquage par la calcéine AM présenté sur la Figure 111A, les HUVEC cultivées dans leur milieu spécifique, l'EGM2, sont toujours vivantes après 7 jours de culture. Cependant, elles ne démontrent aucune organisation en trois dimensions et restent sous une morphologie arrondie. Aucune organisation de type vasculaire n'est observée et nous pouvons en déduire que les HUVEC restent sous une forme quiescente, lorsqu'elles sont cultivées dans leur milieu de culture, dans un environnement 3D et sans apport de facteurs angiogéniques supplémentaires. La culture 3D en présence de leur milieu EGM2 ne permet donc leur auto-organisation. Le même résultat est observé lorsque les HUVEC sont cultivées dans le mélange DMEM/EGM2 (ratio 1 :1). En effet, sur la Figure 111C nous pouvons observer la même

organisation cellulaire arrondie dans l'hydrogel. Les HUVEC restent alors, dans cette condition de culture, sous une forme quiescente. L'ajout de DMEM semble n'avoir aucun impact sur le développement des HUVEC dans un hydrogel 3D.

Lorsque l'hydrogel intégrant les HUVEC a été placé, cette fois-ci, en culture dans le DMEM, milieu de culture des fibroblastes, une dégradation rapide en 12 heures a été observée (Figure 111B). Les MMP pourraient être à l'origine de cette dégradation. Comme nous l'avons dit précédemment, il est généralement connu que les MMP soient sécrétées et activées par les fibroblastes lors du remodelage tissulaire, principalement durant le processus de cicatrisation. Cependant, les MMP sont aussi produites par les cellules endothéliales pendant le phénomène de vasculogénèse et d'angiogénèse⁴⁵⁸⁻⁴⁶⁰. Les cellules endothéliales sécrètent des MMP qui vont digérer la matrice environnante pour permettre aux nouveaux vaisseaux de se développer. De manière similaire à l'étude pour les fibroblastes, une régulation étroite de l'activité des MMP est nécessaire pendant les processus de vasculogénèse et d'angiogénèse car une protéolyse excessive peut causer des dommages indésirables aux cellules, dissoudre la matrice, les molécules d'adhésion cellulaire, et perturber ainsi la maturation des néovaisseaux⁴⁶¹⁻⁴⁶³. De ce fait, les HUVEC bioimprimées dans un hydrogel placé en culture dans le DMEM, un milieu qui ne leur permet pas de se développer en culture 2D, sembleraient recevoir des signaux induisant leur organisation en structures vasculaires, et donc une digestion de l'hydrogel. Cette digestion excessive non contrôlée, aboutit à une dissolution totale de l'hydrogel après 12 heures de culture.

Le graphique présent sur la Figure 111b quantifie le développement cellulaire des HUVEC pendant 7 jours dans le milieu de culture EGM2 et le mélange DMEM/EGM2 (ratio 1/1). Comme nous l'avons identifié précédemment les HUVEC restent rondes dans les deux conditions de culture. Les HUVEC semblent diminuer en nombre le lendemain de la bioimpression. Cette baisse significative peut s'expliquer par la fragilité de ces cellules, subissant des contraintes de cisaillement durant le processus de bioimpression, pouvant induire la mort cellulaire⁴³³. Un développement des HUVEC est par la suite observé après 3 jours de culture. Cependant, en comparaison avec le graphique de développement des fibroblastes, l'intensité de marquage est ici beaucoup faible, ce qui démontre bien un état quiescent des HUVEC lorsqu'elles sont dans un environnement 3D, aussi bien en culture dans leur milieu EGM2 ou dans un mélange EGM2/DMEM.

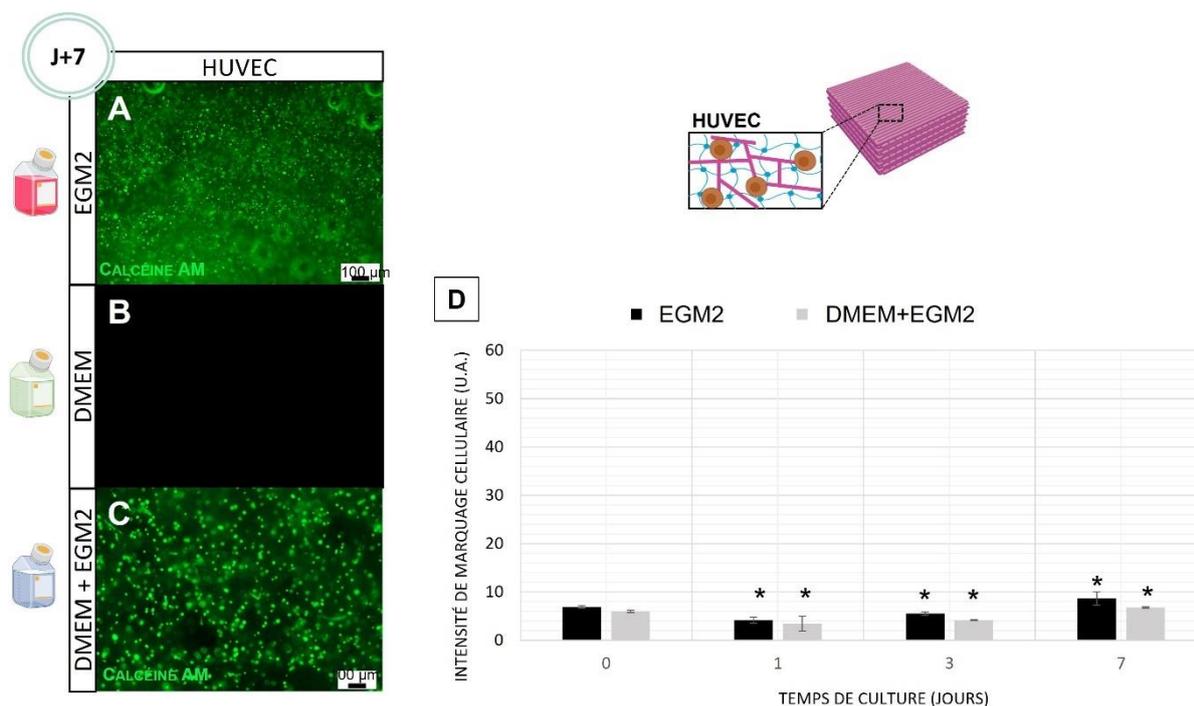


Figure 111 Développement cellulaire des HUVEC à l'intérieur d'un environnement 3D pendant 7 jours de culture. **(A)** Image par microscopie de fluorescence des HUVEC marquées par la calcéine AM après 7 jours de culture dans leur milieu spécifique, l'EGM2, **(B)** dans le milieu de culture des fibroblastes, le DMEM et **(C)** dans un mélange DMEM/EGM2 en quantité équivalente. Barre d'échelle 100 μm. **(D)** Représentation graphique du développement cellulaire des HUVEC cultivées dans l'EGM2 et dans le mélange DMEM/EGM2, pendant 7 jours de culture. n = 4, Valeur-p calculée selon le test t de Welch, * $p < 0,05$ et \emptyset = non significatif.

Ces résultats démontrent donc que les HUVEC bioimprimées dans un hydrogel en culture dans le milieu EGM2 ou dans le mélange DMEM/EGM2, restent sous une morphologie cellulaire arrondie, signe d'un état quiescent. Ces conditions ne sont pas favorables à un auto-assemblage cellulaire. En revanche, lorsqu'elles sont placées en culture uniquement dans le DMEM, l'hydrogel se dissout totalement en 12 heures post bioimpression. Cette conséquence pourrait être s'expliquer par un développement cellulaire excessif des HUVEC lors du développement de microvascularisation, entraînant par conséquent la libération de protéases matricielle. Comme précédemment, cette conséquence de dégradation matricielle, pourra être étudiée par la méthode de zymographie.

Une balance entre la dégradation de l'hydrogel, la synthèse d'une nouvelle matrice propre aux cellules ainsi que le développement d'un réseau microvasculaire est donc à établir.

Pour répondre à cela nous avons étudié l'effet de la co-culture des fibroblastes et des HUVEC à l'intérieur d'un hydrogel bioimprimé, sur le développement potentiel d'un tissu.

II.3. Fibroblastes et HUVEC en co-culture dans la bioencres

De nombreuses études ont démontré l'importance de la co-culture des cellules endothéliales avec les fibroblastes dans la formation de structures microvasculaires^{4,28,464-466}. Effectivement, les fibroblastes, dans un but de reconstruction du tissu, néosynthétisent de la matrice extracellulaire en se différenciant en myofibroblastes, exerçant un impact sur les cellules endothéliales en leur permettant d'adhérer et de développer ainsi des vaisseaux sanguins^{32,467}. De plus, les fibroblastes sont considérés comme des cellules stromales, c'est-à-dire des cellules support permettant le maintien des vaisseaux sanguins nouvellement créés par les cellules endothéliales^{27,28}. Pour comprendre l'impact de cette organisation cellulaire dans un hydrogel en trois dimensions, nous avons co bioimprimés des fibroblastes et des cellules endothéliales.

Pour cela, les fibroblastes et les HUVEC ont été mélangés à la bioencres et bioimprimés à travers une aiguille de 400 µm de diamètre. L'objet a ensuite été consolidé par une solution composée de thrombine de concentration de 10 U/mL et de CaCl₂ de concentration 1,45 mM. L'objet consolidé a ensuite été placé en culture dans différents milieux nutritifs pendant 7 jours puis les cellules vivantes ont été analysées par marquage par la calcéine AM (Figure 112).

Lorsque l'hydrogel composé de fibroblastes et d'HUVEC est cultivé dans le milieu EGM2 (Figure 112A), les cellules vivantes possèdent une morphologie ronde après 7 jours de culture. Cette condition de culture ne leur permet de s'auto-assembler à l'intérieur de la structure 3D. Lorsque l'hydrogel est cette fois-ci placé en culture dans le milieu DMEM, une partie des cellules commencent à se développer à l'intérieur de l'hydrogel mais une majeure partie des cellules restent sous une morphologie arrondie (Figure 112B). Enfin lorsque les HUVEC et les fibroblastes sont cultivés dans un mélange équivalent de EGM2 et DMEM (ratio 1 :1), nous pouvons observer un développement total des cellules à l'intérieur de l'hydrogel avec aucune cellules arrondie (Figure 112C).

Ces résultats sont appuyés par le graphique présenté sur la Figure 112b. Nous avons évalué la prolifération cellulaire à l'intérieur de l'hydrogel, pendant 7 jours de culture, dans les différents milieux de culture. Une différence significative de développement cellulaire a été quantifiée en fonction du milieu de culture de l'hydrogel 3D. Les fibroblastes et les HUVEC démontrent une capacité de prolifération nettement supérieure lorsqu'ils sont placés dans des conditions de culture mixte DMEM/EGM2 (ratio 1 :1) par rapport aux cultures uniquement dans le DMEM ou dans le EGM2.

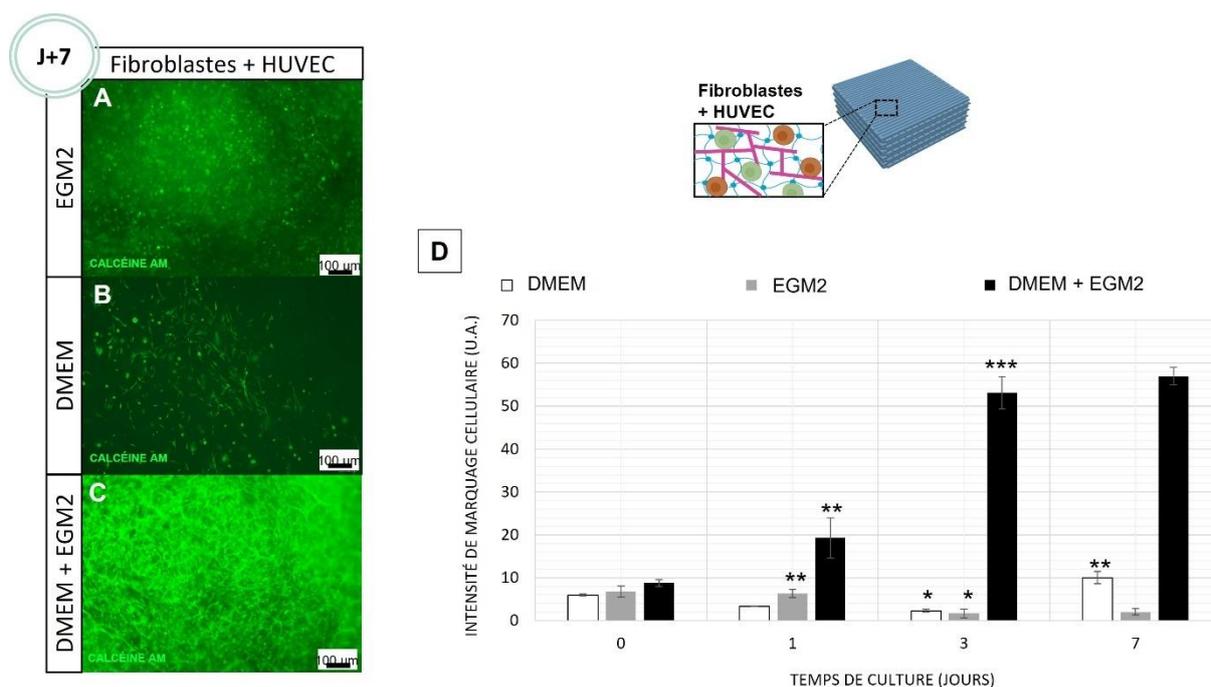


Figure 112 Développement cellulaire des fibroblastes et des HUVEC en co-culture à l'intérieur d'un environnement 3D pendant 7 jours de culture. **(A)** Caractérisation par microscopie de fluorescence des cellules marquées par la calcéine AM après 7 jours de culture dans l'EGM2, **(B)** le DMEM et **(C)** un mélange mixte DMEM/EGM2 (ratio 1 :1) (C). Barre d'échelle 100 µm. **(D)** Représentation graphique du développement cellulaire des fibroblastes et des HUVEC cultivés dans l'EGM2, le DMEM et le mélange DMEM+EGM2, pendant 7 jours de culture. n = 4, Valeur-p calculée selon le test t de Welch, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ et ø = non significatif.

En résumé, ces résultats démontrent qu'une prolifération cellulaire à l'intérieur de l'hydrogel bioimprimé que lorsque les fibroblastes et les HUVEC se trouvent dans un environnement de co-culture mais aussi dans des conditions de culture rassemblant les deux milieux de culture spécifiques : le DMEM et l'EGM2. En effet, l'utilisation d'un seul des deux milieux de culture ne permet pas le développement et l'organisation cellulaire à l'intérieur de l'hydrogel bioimprimé.

Pour aller plus loin dans la compréhension de ces communications entre les HUVEC et les fibroblastes, nous avons ensuite étudié leur développement lorsqu'elles sont localisées dans leurs environnements 3D séparés, grâce à la bioimpression des fibroblastes et des HUVEC dans deux couches différentes à l'intérieur d'un même hydrogel.

II.4. Fibroblastes et HUVEC en co-culture indirecte

Dans cette étude, les fibroblastes et les HUVEC ont été mélangés séparément à la bioencres, de manière à obtenir deux seringues d'impression, de composition en biomatériaux identiques, mais intégrant soit les fibroblastes, soit les HUVEC. La bioencres contenant des HUVEC a d'abord été bioimprimée puis la bioencres contenant des fibroblastes a été bioimprimée par-dessus. De cette manière, nous obtenons un hydrogel composé de deux couches d'épaisseur identiques (400 μm) mais contenant de cellules différentes. Cette étude va nous permettre de comprendre l'importance des communications et donc de la localisation cellulaire, pour le développement d'un tissu.

L'hydrogel bioimprimé a été placé dans différents milieux de culture : l'EGM2, le DMEM et le mélange équivalent 1 :1 des deux (DMEM+EGM2). Après 7 jours de culture, les cellules vivantes ont été marquées par la calcéine AM et visualisées par microscopie de fluorescence afin de déterminer leur organisation cellulaire. Des images de la couche intégrant les HUVEC et de la couche intégrant les fibroblastes ont été prises sur chaque face de l'hydrogel.

D'après la Figure 113A-D, les fibroblastes et les HUVEC en culture dans le milieu EGM2 possèdent une morphologie arrondie. Dans cette condition, les cellules restent vivantes mais ne développent pas de microstructures.

Lorsque l'hydrogel est cultivé dans le milieu de culture DMEM, les fibroblastes et les HUVEC s'auto-organisent afin de développer des microstructures indiquées par les flèches blanches (Figure 113B-E). Les HUVEC se sont assemblées pour former

des structures types vasculaires et les fibroblastes se sont développés et alignés à l'intérieur de leur hydrogel.

Enfin, lorsque l'hydrogel est cultivé dans un mélange 1 :1 des deux milieux, les fibroblastes s'organisent de manière identique à la culture dans le DMEM uniquement et les HUVEC développent des microstructures (flèches) qui semble plus évoluées et définit, suggérant le développement d'un réseau vasculaire (Figure 113C-F).

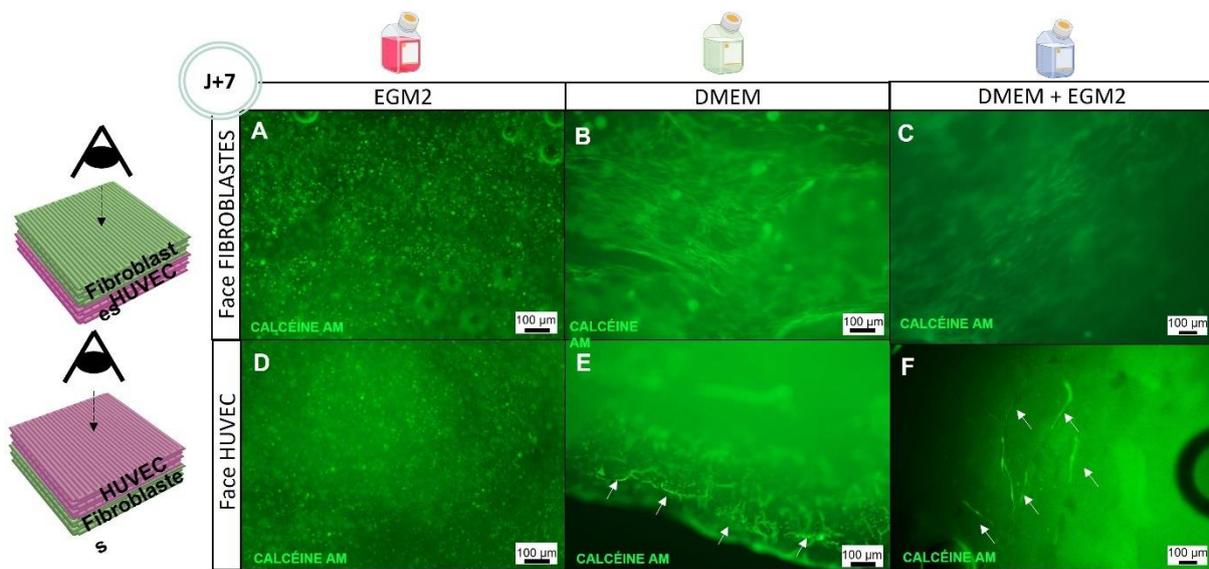


Figure 113 Caractérisation par microscopie de fluorescence après marquage par la calcéine AM, du développement cellulaire à l'intérieur d'un hydrogel multicouche composé d'une couche intégrant les HUVEC (A), (B) et (C) et d'une couche intégrant les fibroblastes (D), (E), et (F) en fonction du milieu de culture, après 7 jours de culture. Les cellules sont marquées à la calcéine AM. Barre d'échelle 100 μm.

En résumé, un auto-assemblage des cellules bioimprimées dans deux couches séparées a pu être mis en évidence lorsque les cellules sont cultivées dans un mélange des deux milieux de cultures (DMEM/EGM2). Effectivement, lorsqu'elles sont placées en culture dans l'EGM2, spécifique aux HUVEC, aucun des deux types cellulaires ne montre une organisation microstructurale et restent sous une morphologie arrondie. Lorsque l'hydrogel multicouche est placé en culture dans le DMEM, les fibroblastes se développent correctement et les HUVEC s'organisent en un réseau tridimensionnel. Enfin, lorsque ces cellules sont cultivées dans le mélange des deux milieux (DMEM/EGM2), les fibroblastes se développent de manière

identique à la culture dans le DMEM uniquement, en revanche les HUVEC se développent d'une manière plus organisée et laisse apparaître un réseau de type microvasculaire.

Le milieu de culture respectif de chacun des deux types cellulaires est donc nécessaire à leurs développements 3D et doit par conséquent être apporté obligatoirement pour l'organisation cellulaire d'un hydrogel multicellulaire. De plus, l'organisation en un réseau tridimensionnel des HUVEC ne semble possible qu'en présence des fibroblastes.

II.5. Communication croisée ou unidirectionnelle ?

Afin de comprendre quels sont les facteurs permettant aux cellules endothéliales de se développer en 3D et notamment comprendre comment les fibroblastes influencent-elles cette organisation, nous avons imaginé plusieurs systèmes de culture mettant en place des communications HUVEC/Fibroblastes différentes.

Les HUVEC ont été bioimprimées et consolidées suivant le protocole que nous avons développé. Les fibroblastes ont été bioimprimés et consolidés selon le même protocole.

L'hydrogel intégrant les HUVEC a ensuite été placé dans quatre conditions de culture différentes (Figure 114).

- a) L'hydrogel d'HUVEC est incubé en présence de fibroblastes cultivées en 2D au fond du même puit de culture, dans un milieu DMEM/EGM2 (1 :1)
- b) L'hydrogel d'HUVEC est incubé en présence d'un hydrogel de fibroblastes dans le même puit de culture, dans un milieu DMEM/EGM2 (1 :1)
- c) L'hydrogel d'HUVEC est incubé seul dans un puit de culture dans de l'EGM2, avec ajout de milieu conditionné de fibroblastes en culture 2D dans du DMEM.
- d) L'hydrogel d'HUVEC est incubé seul dans un puit de culture dans de l'EGM2, avec ajout de milieu conditionné de fibroblastes cultivés en 3D dans un hydrogel dans du DMEM.

Un milieu conditionné correspond à un milieu de culture riche en facteurs synthétisés par les cellules et dans notre cas, correspondant à un prélèvement de milieu de culture 48h après le début de la culture des cellules dans l'hydrogel. En effet, d'après les graphiques observés précédemment, les cellules se développent rapidement entre 1 et 3 jours de culture post

bioimpression et par déduction synthétisent de nombreux facteurs de croissance à ce moment là.

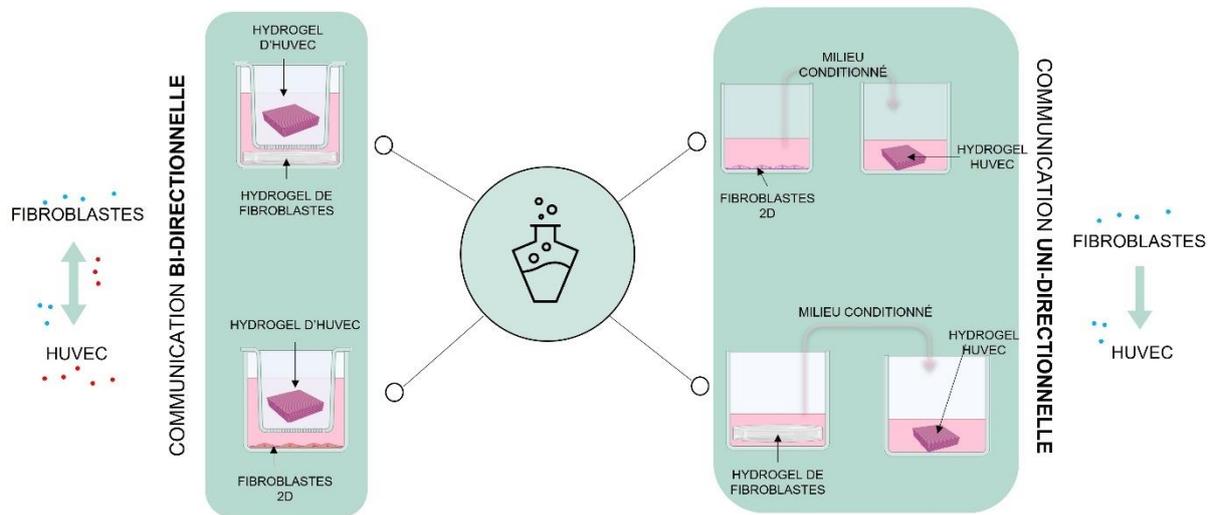


Figure 114 Schéma descriptif des différentes conditions de culture des HUVEC dans un hydrogel 3D pour déterminer les communications bi-directionnelles ou uni-directionnelles qui permettent une organisation tridimensionnelle.

Après 7 jours de culture, les hydrogels d'HUVEC cultivés dans les quatre conditions différentes, ont été marqués par la calcéine AM afin de visualiser le développement des cellules vivantes.

D'après la Figure 115, les HUVEC cultivées dans les conditions a), c) et d), ne présentent pas d'organisation tridimensionnelle. En effet, elles restent sous une morphologie arrondie dans ces trois conditions de culture. Qu'elles soient cultivées en présence de fibroblastes 2D ou avec le milieu conditionné de fibroblastes 2D, les HUVEC maintiennent un état sénescence. Dans ces conditions de culture, les fibroblastes en 2D ne semblent pas sécréter de facteurs angiogéniques, qu'elles soient en absence ou en présence directe des HUVEC. Aucune communication permettant aux HUVEC de s'organiser n'est alors démontrée.

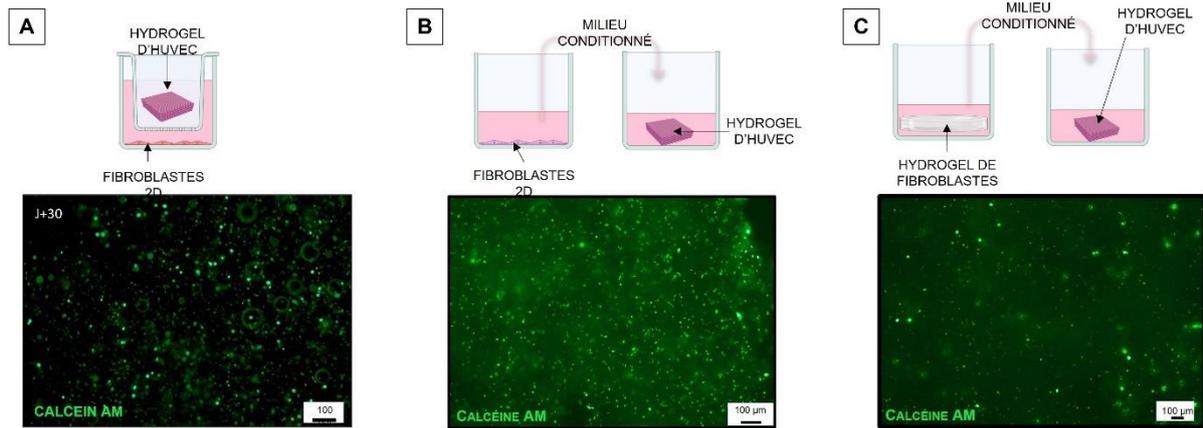


Figure 115 Caractérisation par microscopie de fluorescence après marquage par la calcéine AM d'un hydrogel composé d'HUVEC après 7 jours de culture dans des conditions de culture **a), c) et d)**. Barre d'échelle 100 µm et 50 µm.

En revanche, dans la dernière condition de culture, lorsqu'elles sont cultivées avec des fibroblastes se trouvant aussi dans un environnement 3D, les HUVEC démontrent une organisation tridimensionnelle (Figure 116). En effet une organisation similaire à celles de microvascularisations est observée.

Plus particulièrement, l'organisation des HUVEC indiquée par les flèches blanches sur la Figure 116A, est caractéristique du processus d'angiogenèse³⁶⁶ que nous pouvons comparer sur la Figure 116B, imageant le processus d'angiogenèse théoriquement observée en microscopie.

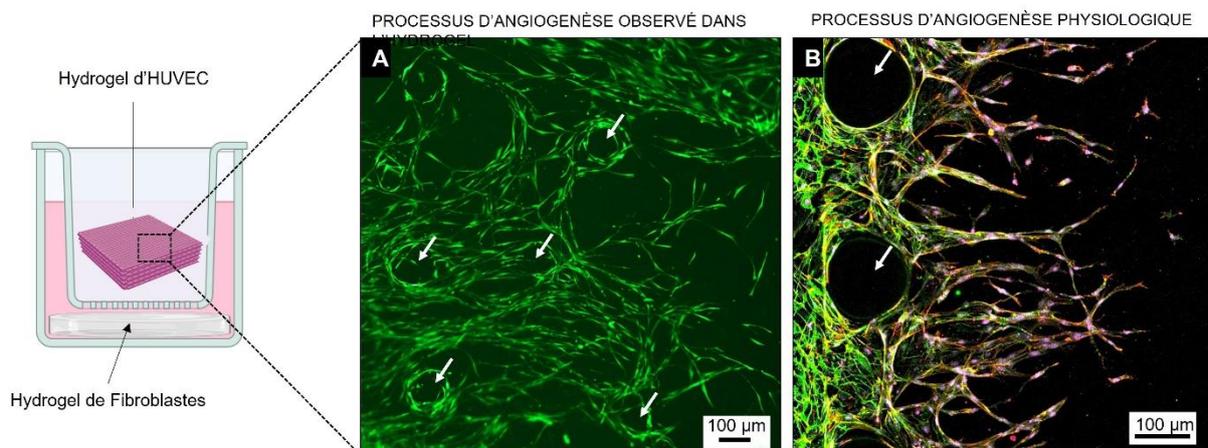


Figure 116 (A) Caractérisation par microscopie de fluorescence après marquage par la calcéine AM, après 7 jours de culture de l'hydrogel d'HUVEC en présence d'un hydrogel de fibroblastes. **(B)** Image microscopique du processus d'angiogenèse⁴⁶⁸. Barre d'échelle 100 µm.

Grâce à cette étude nous pouvons conclure à une communication bidirectionnelle 3D entre les HUVEC et les fibroblastes. Nous pouvons émettre l'hypothèse que les HUVEC s'auto-organisent en 3D grâce à des facteurs solubles sécrétés par les fibroblastes en 3D et que ces derniers ne sécrètent ces facteurs solubles seulement lorsqu'ils sont cultivés en 3D et dans le même environnement que celui des HUVEC en 3D. En effet, les facteurs solubles synthétisés par les fibroblastes et essentiels à l'organisation des HUVEC, ne sont pas sécrétés lorsque les fibroblastes ne sont pas en présence des HUVEC. Une stimulation angiogénique des HUVEC en 3D par les fibroblastes en 3D semble alors nécessaire.

Nous avons cependant constaté une dégradation de l'hydrogel contenant uniquement les HUVEC, même lorsque celui-ci était cultivé en présence d'un hydrogel de fibroblastes. Nous pouvons supposer que la cause serait la forte prolifération et organisation des HUVEC à l'intérieur de l'hydrogel, libérant ainsi de nombreuses protéases telles que les MMP, entraînant la digestion de la bioencore pour créer de nouveaux vaisseaux sanguins, durant l'angiogenèse. Aucune homéostasie matricielle avec inhibition des MMP ne semble s'établir à l'intérieur du tissu contenant uniquement des HUVEC, ce qui peut avoir pour conséquence une dissolution de l'hydrogel en une quinzaine de jours. Pour permettre de solutionner ce problème, une matrice extracellulaire doit être obligatoirement néosynthétisée en parallèle au développement de microvaisseaux par les cellules endothéliales, notamment grâce à la présence de fibroblastes dans le même hydrogel.

II.6. Conclusions

Cette première étude basée sur le développement cellulaire à l'intérieur d'un hydrogel nous a permis de comprendre l'importance des communications pouvant s'établir entre les fibroblastes et les cellules endothéliales, permettant ainsi leurs organisations tridimensionnelles. Cependant, le développement de ces deux types cellulaires n'est pas effectif selon le même environnement de culture.

Les fibroblastes se développent lorsqu'ils sont en présence de leur milieu de culture, le DMEM, qu'ils soient seuls dans un hydrogel, ou en co-culture avec les HUVEC dans un mélange DMEM/EGM2.

Au contraire, les HUVEC ne se développent pas lorsqu'elles sont seules, même en présence de leur milieu de culture, l'EGM2. Elles ne se développent qu'en présence des fibroblastes en co-culture directe, c'est-à-dire soit dans le même hydrogel, soit dans le même environnement de culture, tant que les fibroblastes sont eux aussi dans un environnement en 3D.

La Figure 117 permet de résumer les différentes conditions que nous avons étudié, permettant le développement (✓) ou non (✗) des fibroblastes et des HUVEC, lorsqu'elles sont seules ou en co-culture.

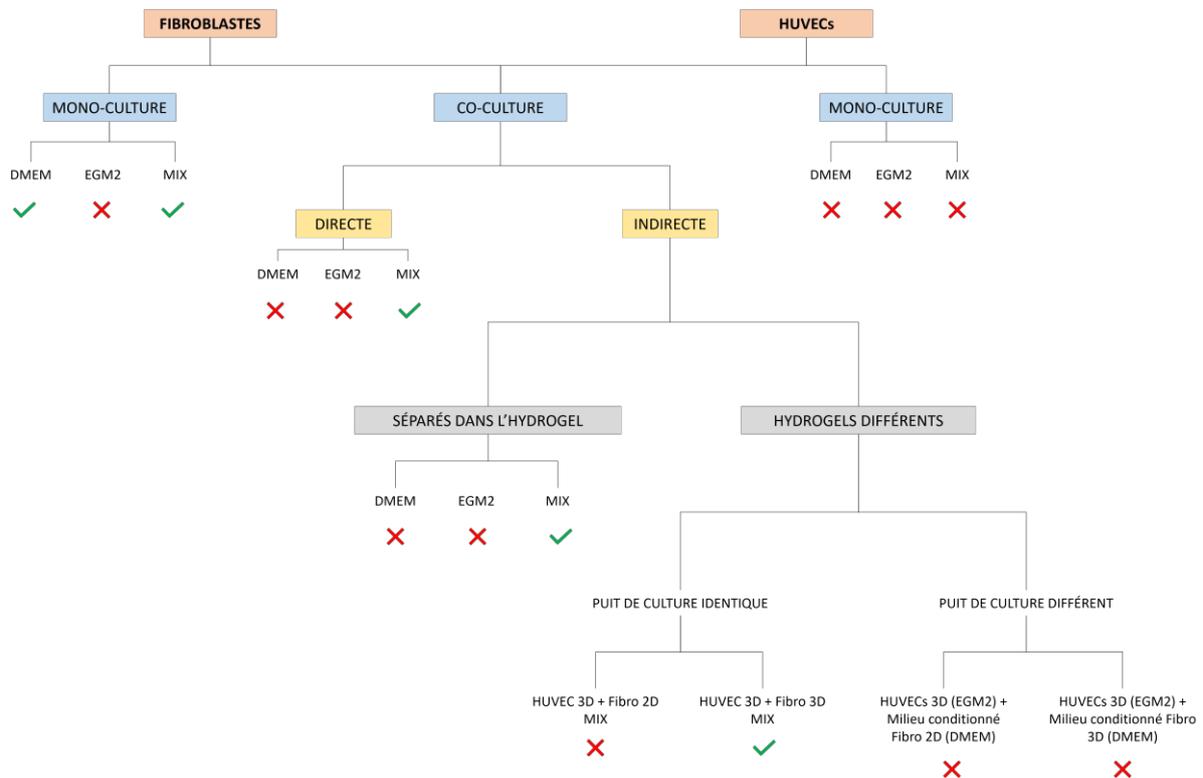


Figure 117 Schéma résumant les différentes conditions de cultures étudiées des fibroblastes et des HUVEC, permettant l'organisation tridimensionnelle des cellules (✓) ou non (✗).

Nous avons donc remarqué le développement d'un réseau tridimensionnel à l'intérieur de notre bioencore, lorsque les fibroblastes et les HUVEC étaient en co-culture, dans un milieu nutritif composé d'un mélange de DMEM et d'EGM2. La nature des structures développées par ces cellules à l'intérieur de l'hydrogel laissant penser à un réseau vasculaire, doit

maintenant être étudiée. Pour cela, des caractérisations histologiques des tissus développés ont été effectuées dans l'étude suivante.

III. L'organisation cellulaire : caractérisations histologiques

Afin de caractériser l'organisation structurelle et l'organisation fonctionnelle à l'intérieur de nos hydrogels bioimprimés, des analyses histologiques ont été réalisées. En effet, après un nombre de jours de culture définit, la culture est stoppée pour identifier le niveau de maturation des cellules composants l'hydrogel. Pour cela, les tissus sont fixés grâce à une solution de paraformaldéhyde, inclus en paraffine, puis différentes coupes sont réalisées. Des analyses par microscopie optique vont permettre d'analyser l'organisation structurelle des tissus par l'intermédiaire de colorations standards. Des analyses par microscopie de fluorescence vont permettre d'analyser l'organisation fonctionnelle des tissus par l'intermédiaire de marquages spécifiques *via* des anticorps.

Dans un premier temps, des colorations standard de Trichrome de Masson et d'hématoxyline et éosine sont appliquées sur les coupes de nos hydrogels afin d'identifier la micro-organisation cellulaire à l'intérieur des hydrogels bioimprimés.

III.1. L'organisation structurelle

III.1.1. La coloration Hématoxyline et Eosine

La coloration par l'hématoxyline et l'éosine (H&E) est une coloration de routine utilisée en histologie. C'est une coloration bichromatique avec un colorant nucléaire, l'hématoxyline, et un colorant cytoplasmique, l'éosine. L'hématoxyline permet alors de révéler les noyaux cellulaires en bleu/violet et l'éosine permet de révéler le cytoplasme cellulaire en rose⁴⁶⁹. Cette coloration va nous permettre d'apprécier les différences d'organisation de notre tissu bioimprimé en fonction des cellulesensemencées dans notre bioencore.

III.1.2. La coloration Trichrome de Masson

La coloration par le Trichrome de Masson (TM) est une coloration de routine utilisée en histologie. Elle permet de mettre en évidence les fibres de collagène dans les tissus. C'est une coloration trichromatique avec l'hématoxyline, l'érythrosine et le vert lumière. L'hématoxyline permet alors de révéler les noyaux cellulaires en bleu foncé/noir, l'érythrosine permet de colorer le cytoplasme cellulaire en violet et le vert lumière permet de révéler les fibres de collagène en bleu/vert⁴⁶⁹. Cette coloration va nous permettre d'évaluer la sécrétion de collagène néosynthétisé par les fibroblastes.

III.1.3. Témoin négatif : bioencres acellulaires

Un hydrogel de notre bioencres non ensemencé a été bioimprimé pour nous servir de témoin négatif. Toutes les étapes décrites durant le chapitre II concernant la préparation de la bioencres, la bioimpression 3D, la consolidation de l'objet et la culture de l'hydrogel, ont été reproduites à l'identique.

Une coloration par l'hématoxyline et l'éosine a été réalisée. Sur la Figure 118, aucune coloration particulière n'est identifiée et l'ensemble de l'hydrogel de bioencres est homogène avec une couleur générale rose foncée/fuchsia. Les porosités identifiées correspondent au réseau de polymères formé grâce à la solution de consolidation post-bioimpression (Figure 118).

La coloration, par le Trichrome de Masson, de la bioencres bioimprimée sans cellules nous laisse observer une coloration rose pâle de bruit de fond, signe de l'absence totale de marquages non spécifiques vert de fibres de collagène. Les structures bioimprimées ne présentent donc aucune coloration non spécifique ce qui signifie que les colorations qui seront observées ultérieurement sont totalement spécifiques aux cellules bioimprimées et à la matrice extracellulaire néosynthétisée par ces cellules.

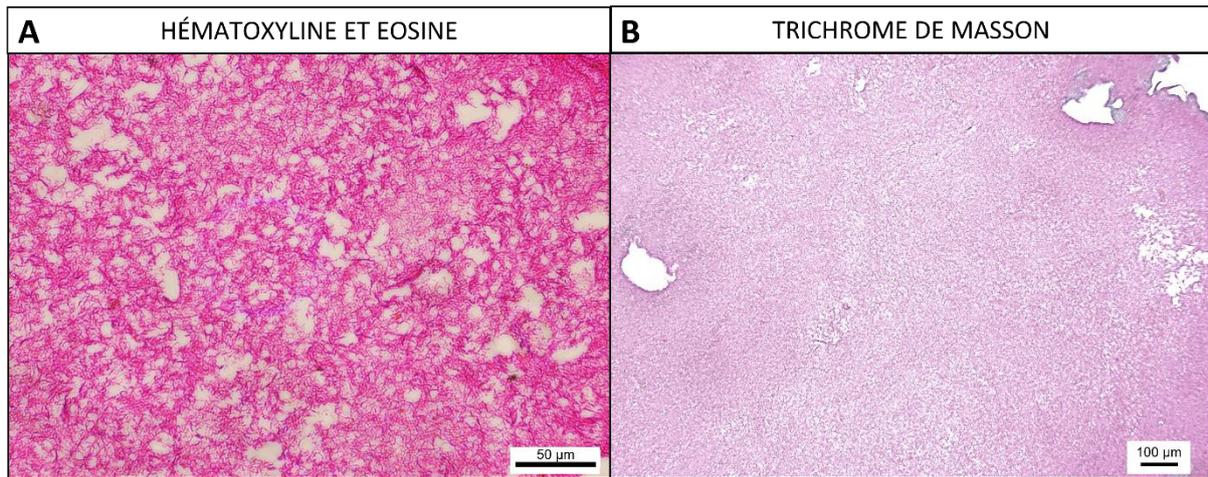


Figure 118 Caractérisation histologique des contrôles négatifs des hydrogels bioimprimés sans cellules. **(A)** Coloration Hématoxyline et Eosine et **(B)** coloration Trichrome de Masson. Coupe de 5 µm, barre d'échelle 50 et 100 µm.

Après avoir défini nos contrôles négatifs, nous allons pouvoir caractériser les différences d'organisation cellulaire à l'intérieur des hydrogels que nous avons bioimprimé précédemment et dont les conditions de culture optimales ont été prédéfinies :

- Un hydrogel contenant uniquement des fibroblastes
- Un hydrogel contenant uniquement des HUVEC
- Un hydrogel composé d'une couche de fibroblastes et d'une couche d'HUVEC
- Un hydrogel composé d'un mélange de fibroblastes et d'HUVEC

III.1.4. Hydrogel de fibroblastes

Un hydrogel contenant uniquement des fibroblastes ($0,25 \cdot 10^6$ cellules/mL) a été bioimprimé puis cultivé pendant 7 jours dans le milieu de culture DMEM. Une analyse structurale par coloration H&E et TM a été réalisée, afin d'identifier le niveau d'organisation des fibroblastes dans notre bioencore.

i. Coloration H&E

Après 7 jours de culture, nous pouvons remarquer deux organisations cellulaires différentes sur la Figure 119. En effet, l'intérieur de l'hydrogel est composé de nombreux fibroblastes, distribués de manière homogène. La périphérie de l'hydrogel quand à elle, est composée d'une

quantité remarquable de fibroblastes, ayant développé une couche très dense. Cela pourrait être expliqué par le fait que durant le remodelage tissulaire, les fibroblastes se différencient en myofibroblastes pour dégrader l'environnement de la bioencore afin de reconstruire leur propre matrice extracellulaire. En effet, nous allons voir plus tard dans ce chapitre que durant cette phase, les myofibroblastes vont migrer et proliférer à l'intérieur de l'hydrogel pour remodeler l'hydrogel, jusqu'à atteindre la périphérie du tissu. Les fibroblastes à l'intérieur du tissu néosynthétisé vont rester sous forme sénescence tant que le tissu sera dans des conditions de culture optimales et vont maintenir la structure matricielle durant toute la durée de vie du tissu. Cette organisation cellulaire développée à l'intérieur de notre hydrogel mime l'organisation d'un néoderme, avec une structure de type tissu conjonctif dense au centre, que nous avons développé en 7 jours de culture.

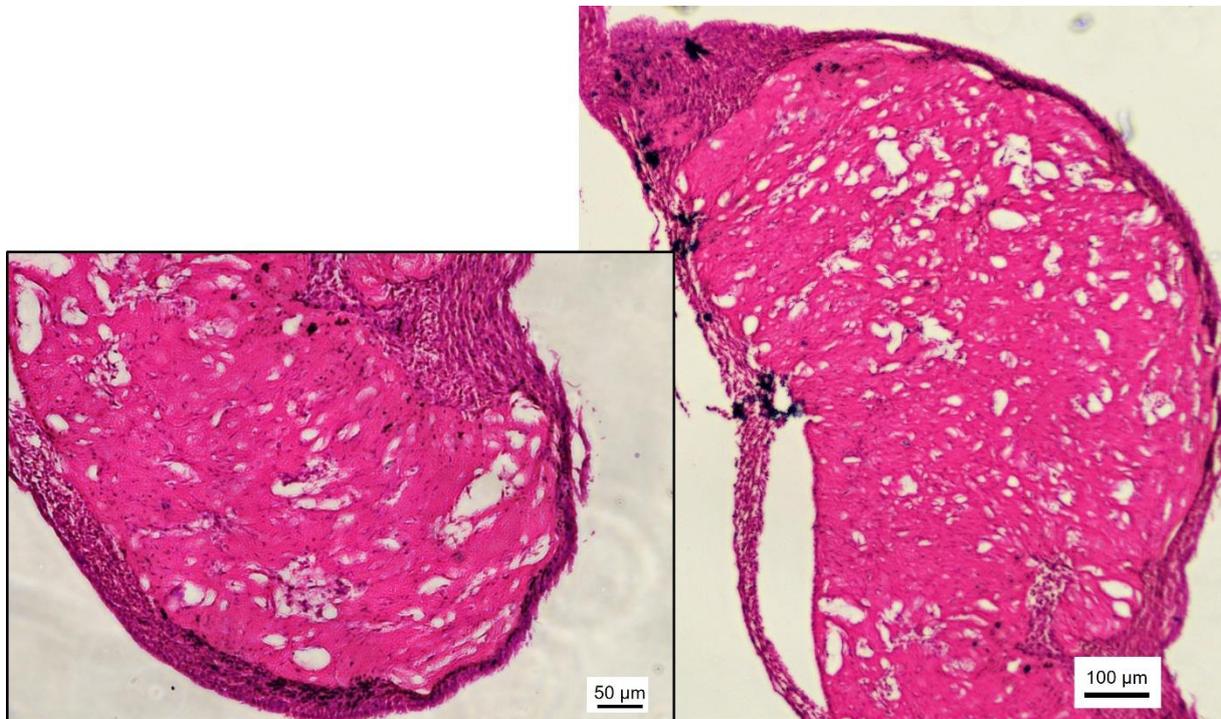


Figure 119 Caractérisation histologique par coloration Hématoxyline et Eosine d'un hydrogel composé de fibroblastes, après 7 jours de culture. Coupe de 5 μm , barre d'échelle 100 μm et 50 μm dans l'insert.

ii. Coloration Trichrome de Masson

Nous avons évalué l'organisation des fibroblastes dans notre hydrogel grâce à la coloration H&E. Pour valider le développement d'un néoderme, une coloration par le Trichrome de Masson a été effectuée pour identifier la synthèse matricielle des fibroblastes. En effet, le

développement d'un tissu fonctionnel repose sur la fabrication d'une matrice néosynthétisée par les cellules. Il est clairement identifiable sur la Figure 120 que l'ensemble de l'hydrogel possède une couleur bleu/verte, identifiant ainsi les fibres de collagène sécrétées par les fibroblastes. En effet, la comparaison avec notre contrôle négatif effectué auparavant est évidente (Figure 118B). Les fibroblastes démontent là encore une organisation centrale homogène et forment une structure dense sur toute la périphérie. Cette coloration TM pourrait, là encore, mettre en évidence l'activité de prolifération et de maturation des (myo)fibroblastes à l'intérieur de notre bioencore.

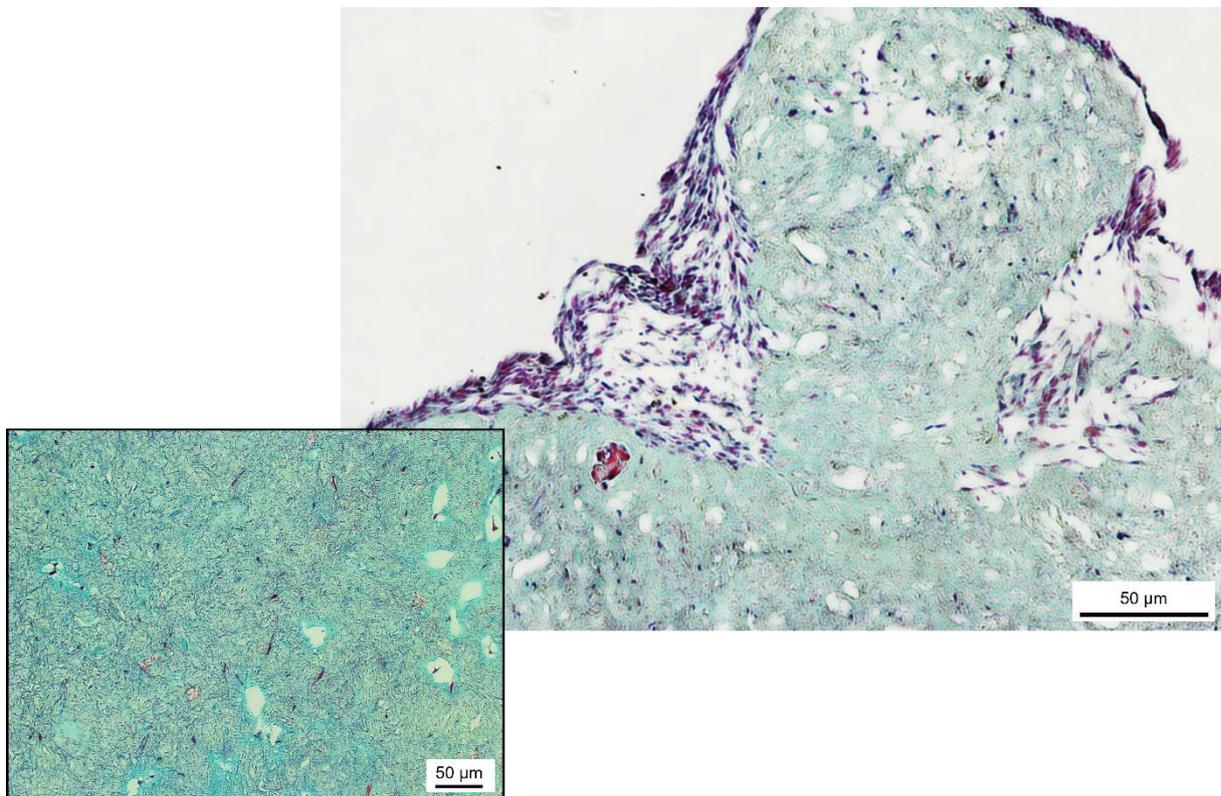


Figure 120 Caractérisation histologique par le Trichrome de Masson d'un hydrogel bioimprimé composé de fibroblastes après 7 jours de culture. Coupe de 5 μm, barre d'échelle 50 μm.

III.1.5. Hydrogel de cellules endothéliales

Un hydrogel contenant uniquement des HUVEC ($1,0 \cdot 10^6$ cellules/mL) a été bioimprimé puis cultivé pendant 7 jours dans le milieu de culture EGM2. Une analyse structurale par coloration H&E et TM a été réalisée, afin d'identifier le niveau d'organisation des HUVEC dans notre bioencore.

i. Coloration H&E

D'après la Figure 121, après 7 jours de maturation à l'intérieur de l'hydrogel, nous pouvons remarquer une organisation cellulaire homogène présentée par les noyaux cellulaires en violet foncé (flèche). En effet, les HUVEC sont réparties dans toute la structure de l'hydrogel. Cependant, aucune organisation tridimensionnelle des cellules entre elles n'est pas constatée. Les HUVEC restent sous une morphologie arrondie. Aucune communication cellule-cellule n'est établit. Cette coloration H&E nous permet de mettre en évidence que les HUVEC seules dans l'hydrogel ne forment aucune structure tridimensionnelle et ne peuvent donc pas développer de structures microvasculaires dans ces conditions.

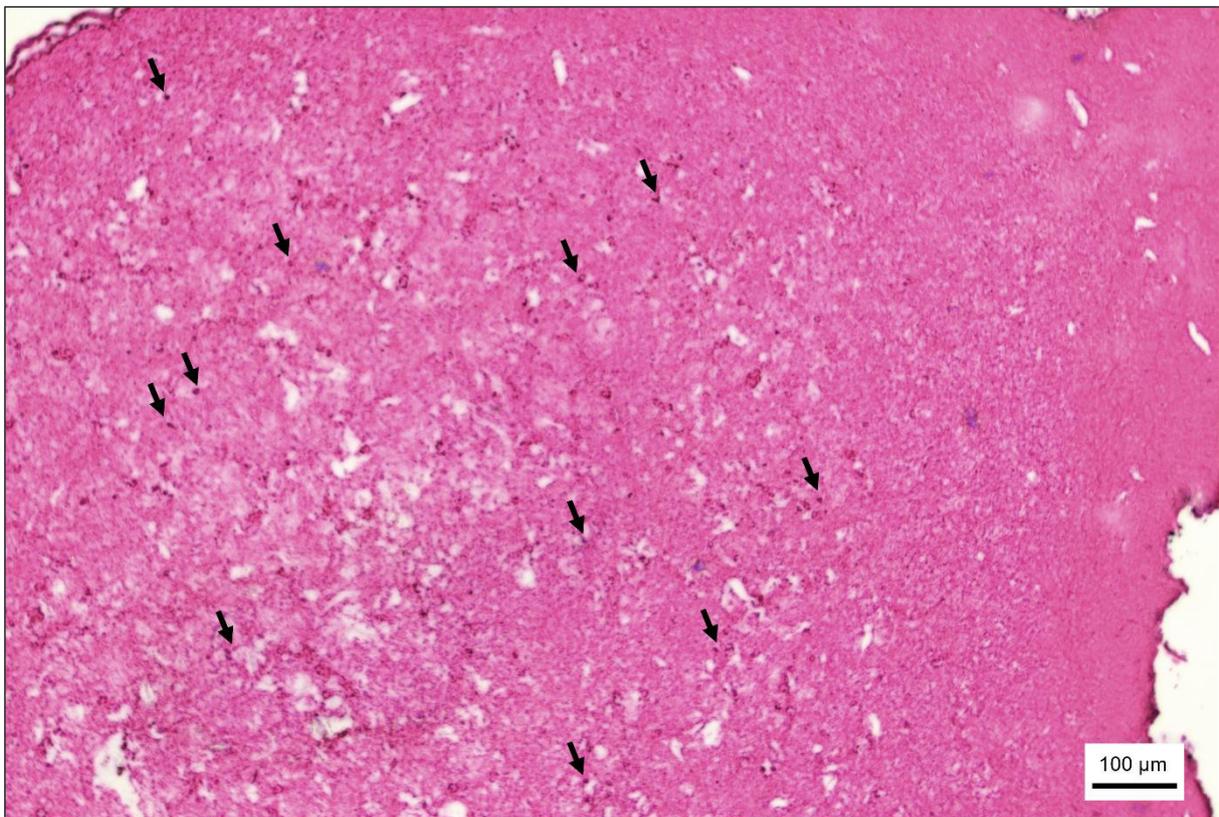


Figure 121 Caractérisation histologique par coloration Hématoxyline et Eosine d'un tissu composé uniquement d'HUVEC, après 7 jours de maturation. Les cellules restent rondes dans l'ensemble du tissu. Coupe de 5 µm, barre d'échelle 100 µm.

ii. Coloration Trichrome de Masson

Comme pour les fibroblastes, nous avons réalisé une coloration de Trichrome de Masson de l'hydrogel contenant uniquement des HUVEC. Celle-ci nous permet de mettre en évidence une coloration rose pâle dans l'ensemble de l'hydrogel (Figure 122) ainsi que la présence de

cellules de manière homogène présentées par des noyaux colorés en bleu foncé (flèches). Ce résultat est en accord avec nos attentes puisque les HUVEC ne sécrètent pas de matrice extracellulaire. Pour résumer ces résultats, après 7 jours de culture, les HUVEC se trouvent toujours à l'intérieur d'hydrogel mais ne forment aucune organisation entre elles.

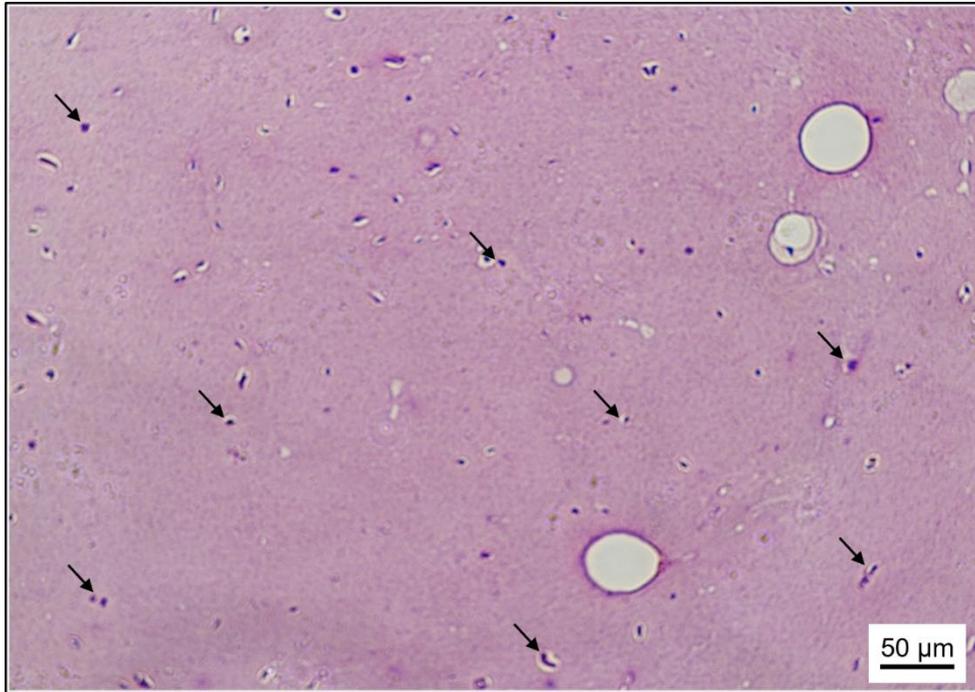


Figure 122 Caractérisation histologique par coloration de Trichrome de Masson d'un hydrogel contenant des HUVEC après 7 jours de culture. Coupe de 5 µm, barre d'échelle 50 µm.

III.1.6. Fibroblastes et HUVEC en co-culture indirecte

Pour cette étude structurale, nous avons étudié l'organisation cellulaire quand les fibroblastes et les HUVEC sont en culture 3D séparée. Pour cela, nous avons testé deux conditions différentes : (i) la bioimpression dans le même hydrogel de deux couches cellulaires différentes composées soit des fibroblastes soit des HUVEC (condition détaillée p.270) et (ii) la bioimpression de deux hydrogels différents composés soit de fibroblastes soit d'HUVEC et cultivés dans le même puit de culture (condition b détaillée p272). Nous avons précédemment constaté que dans les deux cas une organisation tridimensionnelle des cellules était possible. Pour valider ces résultats, des marquages histologiques ont été effectués.

Pour cette étude nous avons réalisé uniquement la coloration de Trichrome de Masson, qui nous permet de mettre en évidence la sécrétion de matrice par les fibroblastes et de distinguer plus clairement l'organisation des cellules dans le cas des hydrogels d'HUVEC.

i. Coloration Trichrome de Masson

Après 7 jours de culture, et dans les deux conditions de bioimpression, les fibroblastes présentent la même organisation cellulaire homogène au sein de l'hydrogel (Figure 123 A et B). Une coloration bleue/verte est également visible, définissant ainsi une néosynthèse matricielle abondante dans les deux conditions de culture. Concernant l'organisation structurelle des HUVEC, nous pouvons identifier une présence remarquable de cellules et de microstructures lorsqu'elles sont en culture en présence de fibroblastes, qu'ils soient dans le même hydrogel (Figure 123C) ou dans un hydrogel différent (Figure 123D).

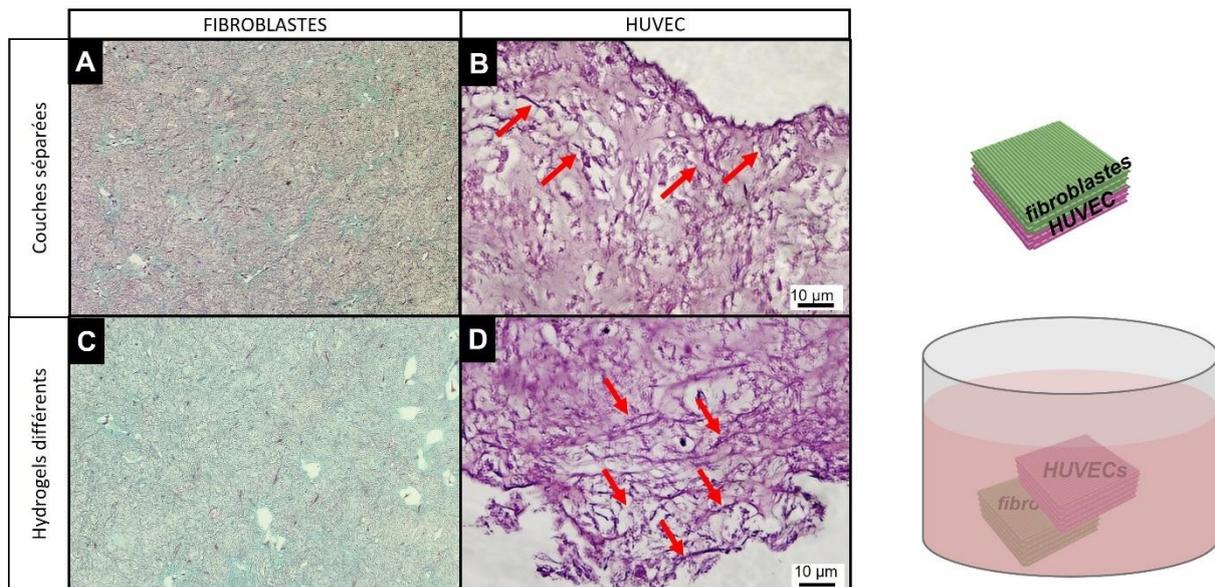


Figure 123 Caractérisations histologiques par Trichrome de Masson des deux conditions de co-culture indirecte des fibroblastes et des HUVEC. **(A)** et **(C)** organisation des fibroblastes et des HUVEC en culture dans le même hydrogel 3D mais dans deux couches séparées. **(B)** et **(D)** organisation des fibroblastes et des HUVEC dans deux hydrogels différents et cultivés dans le même environnement de culture. Coupe de 5 μm , barre d'échelle de 10 μm .

Grâce à de cette étude, nous avons pu conclure sur la présence nécessaire des fibroblastes dans l'organisation des cellules endothéliales. Lorsque les HUVEC sont cultivées seules dans un hydrogel, aucune organisation et microstructures ne se développent.

Concernant l'hydrogel composé d'une couche de fibroblastes et d'une couche d'HUVEC, les fibroblastes finissent par digérer ou migrer à l'intérieur de la couche d'HUVEC. Ce phénomène aboutit alors à la formation d'un hydrogel qui semble homogène avec les fibroblastes et les HUVEC localisés au sein d'une couche unique.

Dans l'étude suivante nous allons caractériser l'organisation cellulaire des fibroblastes et des HUVEC lorsqu'elles sont bioimprimées dans le même hydrogel, en co-culture directe dans le milieu mixte (DMEM/EM2).

III.1.7. Fibroblastes et HUVEC en co-culture directe

Des fibroblastes ($0,25 \cdot 10^6$ cellules/mL) et des HUVEC ($1,0 \cdot 10^6$ cellules/mL) ont étéensemencées à la bioencre, puis bioimprimés et cultivés pendant 7 jours à 37°C. Les hydrogels ont été fixé en présence de PFA et analysés en histologie grâce à la coloration Hématoxyline et Eosine et Trichrome de Masson afin de décrire l'organisation cellulaire.

i. Coloration Hématoxyline et Eosine

Un tissu composé de fibroblastes et d'HUVEC co-imprimés dans la même bioencre, a été observé après 7 jours de culture *in vitro*. Sur les images de microscopie présentées sur la Figure 124, nous pouvons observer des structures tridimensionnelles complexes formées à l'intérieur de notre tissu. Sur la Figure 124A, le tissu présente deux organisations différentes : une structure dense sur la gauche et une structure beaucoup plus lâche sur la droite. Cette organisation est celle d'un tissu conjonctif lâche aussi appelé tissu aréolaire^{470,471}. Cette structure tissulaire est présente dans la majorité des tissus humain, notamment dans la peau et autour des vaisseaux sanguin. Le tissu conjonctif est formé globalement de fibres de collagène et de microvaisseaux.

Sur la Figure 124B, nous pouvons identifier une organisation microvasculaire (flèches) développée par les HUVEC. Ces microvaisseaux sont identifiables dans tout le cœur de

l'hydrogel. En effet, la vasculogenèse et l'angiogenèse sont des phénomènes qui se produisent principalement dans des zones tissulaires privées d'oxygène.

Les Figure 124C et D représentent l'organisation structurale à l'intérieur d'un tissu conjonctif humain. Nous pouvons ainsi comparer facilement l'organisation de ce tissu humain avec l'organisation observée dans notre tissu bioimprimé.

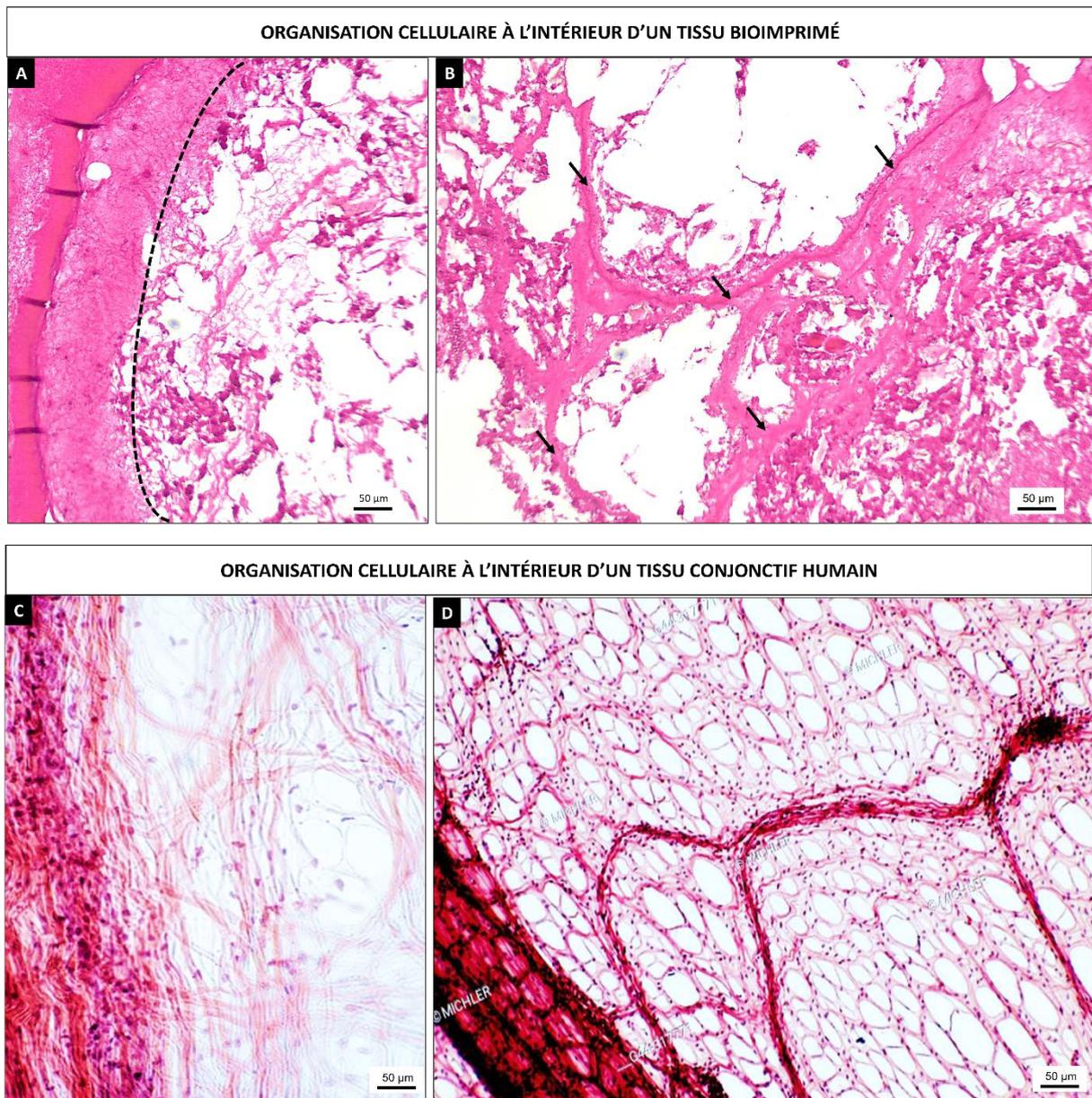


Figure 124 Caractérisation histologique par coloration Hématoxyline et Eosine d'un hydrogel bioimprimé composé de fibroblastes et d'HUVEC après 7 jours de maturation. **(A)** Vue générale avec deux organisations tissulaire distinctes en fonction de la profondeur dans le tissu : une organisation dense à gauche des pointillés, en périphérie du tissu et une organisation plus lâche à droites des pointillés, au cœur du tissu. **(B)** Organisation

cellulaire au centre de l'hydrogel avec le développement de microvascularisations identifiées par les flèches. Coupe de 5 μm , barre d'échelle de 100 μm . **(C)** et **(D)** Images de l'organisation cellulaire à l'intérieur d'un tissu conjonctif humain, tirées de [®]MICHELER/AGEFOTOSTOCK⁴⁷².

Une organisation vasculaire des HUVEC semble donc s'être développée à l'intérieur de notre hydrogel bioimprimé. Pour déterminer la néosynthèse de matrice extracellulaire par les fibroblastes dans cette condition de culture, une coloration de Trichrome de Masson a été réalisée.

ii. Coloration Trichrome de Masson

Grâce à la coloration de Trichrome de Masson, nous pouvons observer une coloration bleue/verte dans la totalité de notre tissu bioimprimé après 7 jours de culture (Figure 125). Cette coloration nous permet d'affirmer que les fibroblastes, co-imprimés avec les HUVEC, sécrètent ici aussi leur propre matrice extracellulaire, même en présence des HUVEC.

Trois organisations distinctes sont identifiables à l'intérieur de ce tissu : une couche superficielle de fibroblastes organisés de manière longitudinale sur toute la périphérie du tissu (Figure 125A, haut), une zone dense de cellules et de matrice extracellulaire en dessous de la couche superficielle de fibroblastes (Figure 125A, bas) et une zone microvasculaire développée à l'intérieur d'une matrice extracellulaire plus lâche (Figure 125B).

Les Figure 124C et D représentent des vues rapprochées de la zone microvasculaire présente sur la Figure 124B. Les microvaisseaux possèdent une couleur verte très claire avec des noyaux violets et identifiés par des flèches rouges. La matrice de collagène est identifiée par des astérisques rouges.

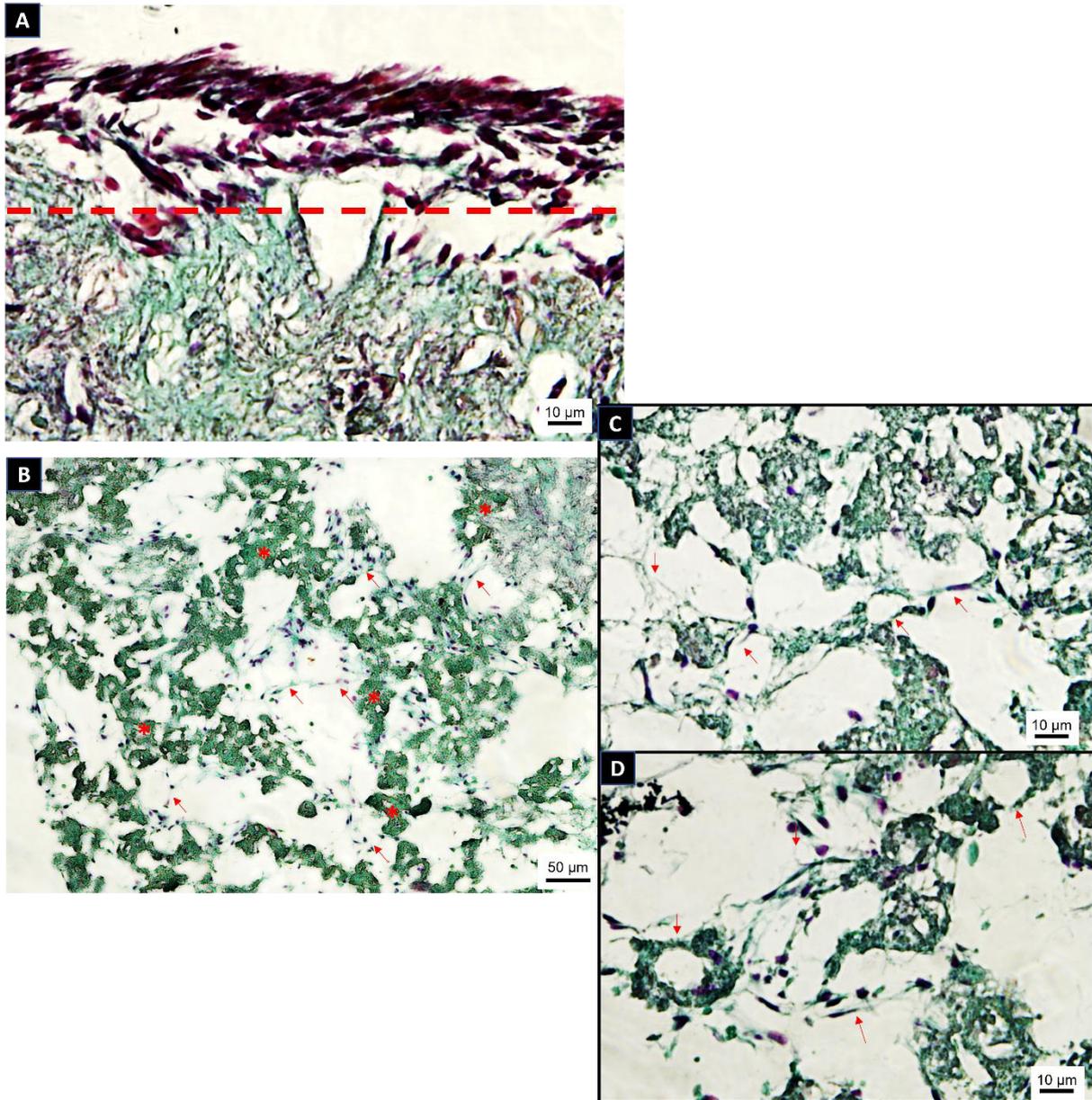


Figure 125 Caractérisations histologiques par coloration Trichrome de Masson d'un tissu bioimprimé composé de fibroblastes et d'HUVEC après 7 jours de maturation. **(A)** Une zone superficielle de fibroblastes au dessus des pointillés rouge et une zone dense de matrice en dessous des pointillés. **(B)** Organisation microvasculaire des cellules endothéliales (flèches) dans une matrice (astérix). **(C) et (D)** Vues rapprochées des microvascularisations (flèches). Coupe de 5 μm, barres d'échelle 50 μm et 10 μm.

III.1.8. Conclusions

Les colorations histologiques que nous avons effectuées sur les différents tissus bioimprimés avec des compositions cellulaires différentes nous permettent d'identifier des organisations structurales tissulaires totalement différentes et dictées directement par les cellules

présentes dans l'hydrogel. En effet, lorsqu'ils sont seuls, les fibroblastes néosynthétisent de la matrice extracellulaire pour former un tissu dense de type néoderme. De leur côté, lorsque les HUVEC sont bioimprimées seules, nous n'observons ni sécrétion de matrice extracellulaire, ni organisation microstructurale. Les HUVEC restent sous une morphologie arrondie malgré la culture dans leur milieu de culture spécifique. Lorsque les HUVEC sont maintenant en co-culture avec les fibroblastes, dans le même hydrogel, dans deux couches d'hydrogels différentes, ou dans deux hydrogels séparés mais dans le même environnement, elles s'organisent en un réseau microstructural suggérant de la microvascularisation. Une communication croisée entre les fibroblastes et les HUVEC semble donc avoir lieu.

La coloration Trichrome de Masson nous a permis de démontrer la synthèse d'une matrice extracellulaire par les fibroblastes avec la présence d'une coloration bleu/verte dans l'ensemble de l'hydrogel. De plus, le tissu composé de fibroblastes et d'HUVEC a permis la formation en 7 jours d'un tissu complexe organisé selon un tissu conjonctif lâche avec une organisation microvasculaire au cœur de l'hydrogel et une organisation dense de cellules en périphérie.

Maintenant que l'organisation structurelle de nos cellules dans un hydrogel bioimprimé a pu être identifié, nous allons caractériser l'organisation fonctionnelle de ces cellules.

III.2. L'organisation fonctionnelle

La technique d'immunomarquage a été utilisé afin de démontrer une organisation fonctionnelle de nos tissus bioimprimés. Des contrôles négatifs ont été réalisés sur des hydrogels bioimprimés sans cellules pour s'assurer de la non-réactivité avec les biomatériaux présents dans la bioencre ainsi que sur des hydrogels bioimprimés avec les cellules pour s'assurer de la spécificité des anticorps. Aucun marquage non spécifique n'a été identifié pour les différents anticorps que nous allons utiliser.

III.2.1. Les myofibroblastes : α -SMA

Afin de déterminer dans un premier temps la présence de fibroblastes et notamment la présence des myofibroblastes, phénotype permettant la néosynthèse de matrice, nous avons utilisé le marquage des filaments d'actine, l' α -SMA, produit par les fibroblastes actifs lors du remodelage tissulaire^{32,451}. Dans notre étude, les fibroblastes vont remodeler leur environnement, ici la bioencore, en la dégradant grâce à la sécrétion de protéases, pour néosynthétiser leur propre matrice extracellulaire¹⁰⁴. Lors de cette étape de prolifération, les fibroblastes vont se différencier en un phénotype dit « actif », autrement nommé, myofibroblastes.

Après 7 jours de culture, les tissus ont été fixé par le PFA, marqués par des anticorps dirigés contre les filaments d'actines puis observés par immunofluorescence. La Figure 126 indique distinctement la présence de myofibroblastes principalement à la périphérie du tissu. En effet, après la bioimpression, les fibroblastes vont être activés dans l'ensemble de l'hydrogel pour permettre un remodelage tissulaire, puis ils vont sécréter de la matrice extracellulaire et migrer vers l'extérieur du tissu jusqu'à remodeler la totalité du tissu.

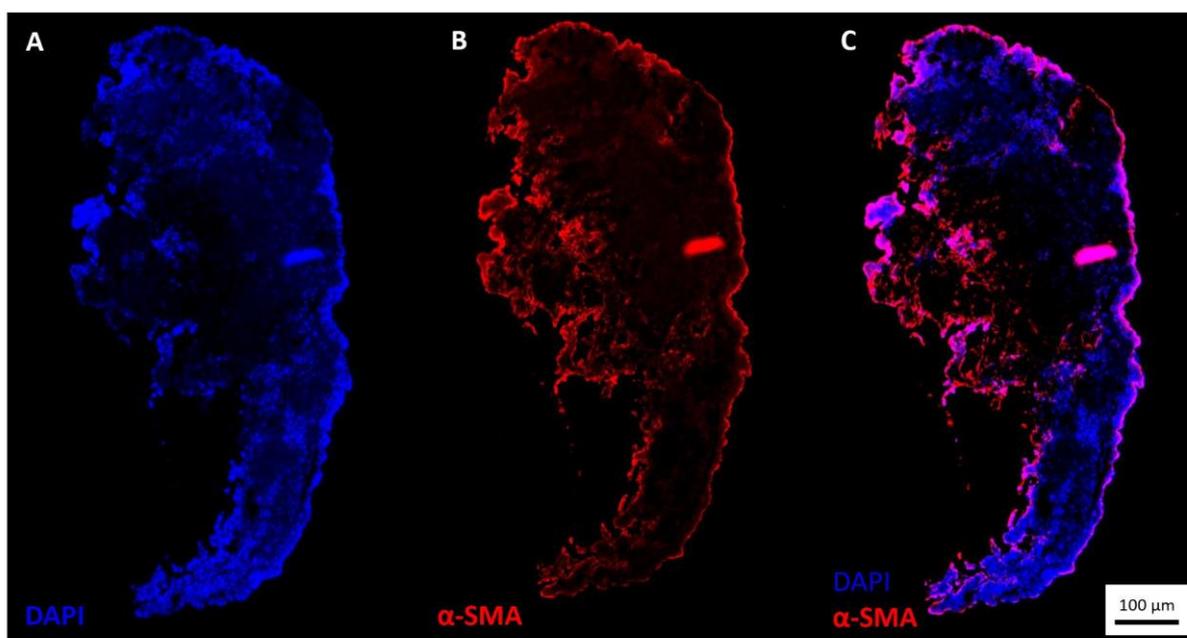


Figure 126 Caractérisations par immunofluorescence des myofibroblastes présents dans un tissu bioimprimé composé de fibroblastes et d'HUVEC, après 7 jours de maturation. (A) Marquage DAPI des noyaux cellulaires, (B) marquage de l'actine des myofibroblastes (rouge), (C) superposition des marquages DAPI et α -SMA. Coupe de 10 μ m, barre d'échelle de 100 μ m.

Comme nous venons de le constater, après 7 jours de culture les myofibroblastes se trouvent en majorité à la périphérie du tissu. Nous avons alors étudié les phases de prolifération de ces myofibroblastes en fonction des temps de culture à l'intérieur de nos hydrogels. Pour cela, des hydrogels bioimprimés composés de fibroblastes et d'HUVEC ont été fixés chaque jour, pendant 7 jours, puis un marquage de l' α -SMA a été effectué sur chacun des échantillon. Une quantification du signal de α -SMA observé sur les différentes coupes a alors été quantifié et représenté sur la Figure 127.

D'après ce graphique, les myofibroblastes sont de plus en plus nombreux jusqu'à atteindre une intensité de marquage maximale au 5^{ème} jour de culture avant de voir leur nombre décroître. Cela signifie que les myofibroblastes exercent une fonction de remodelage tissulaire importante durant les 5 premiers jours de culture de notre hydrogel avec une stabilisation du tissu par la suite.

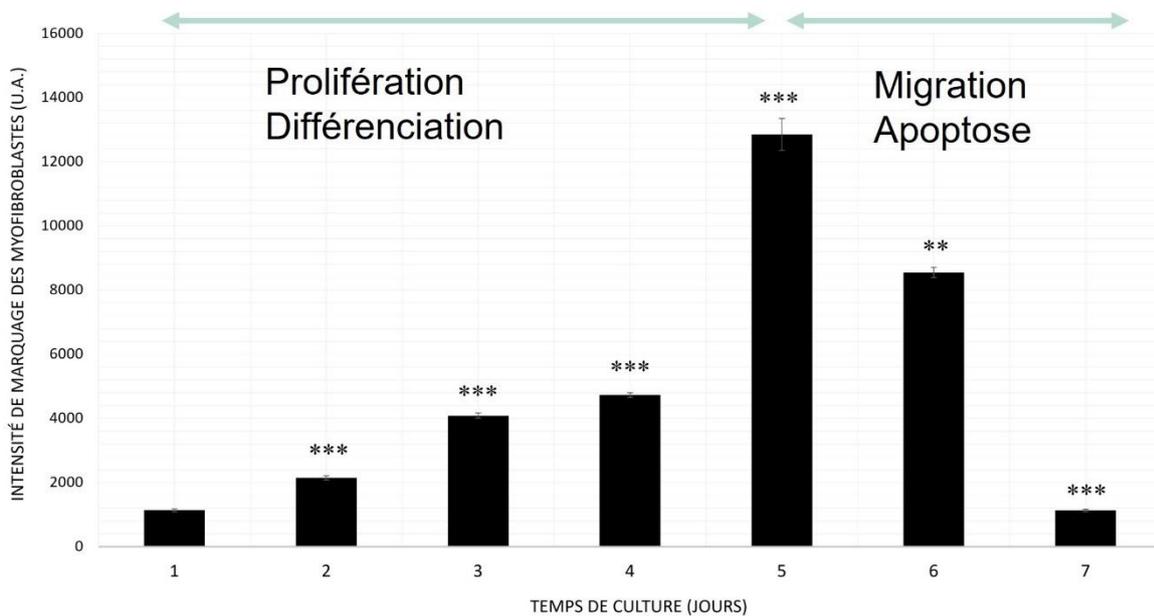


Figure 127 Représentation graphique du développement des myofibroblastes dans un hydrogel en fonction du nombre de jours de culture pendant 7 jours. $n = 4$, Valeur- p calculée selon le test t de Welch, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Pour appuyer les informations obtenues grâce au graphique précédent, la Figure 128 présente les différentes images du marquage de l' α -SMA présent dans nos hydrogels à plusieurs temps

de culture. Nous pouvons observer la présence et l'organisation des myofibroblastes en fonction des différents jours de culture. Comme nous l'avons vu précédemment, les fibroblastes sont différenciés directement après bioimpression pour synthétiser leur propre environnement. Puis la quantité de myofibroblastes diminue au cours du temps, avec un faible taux maintenu en périphérie du tissu tout au long de la culture.

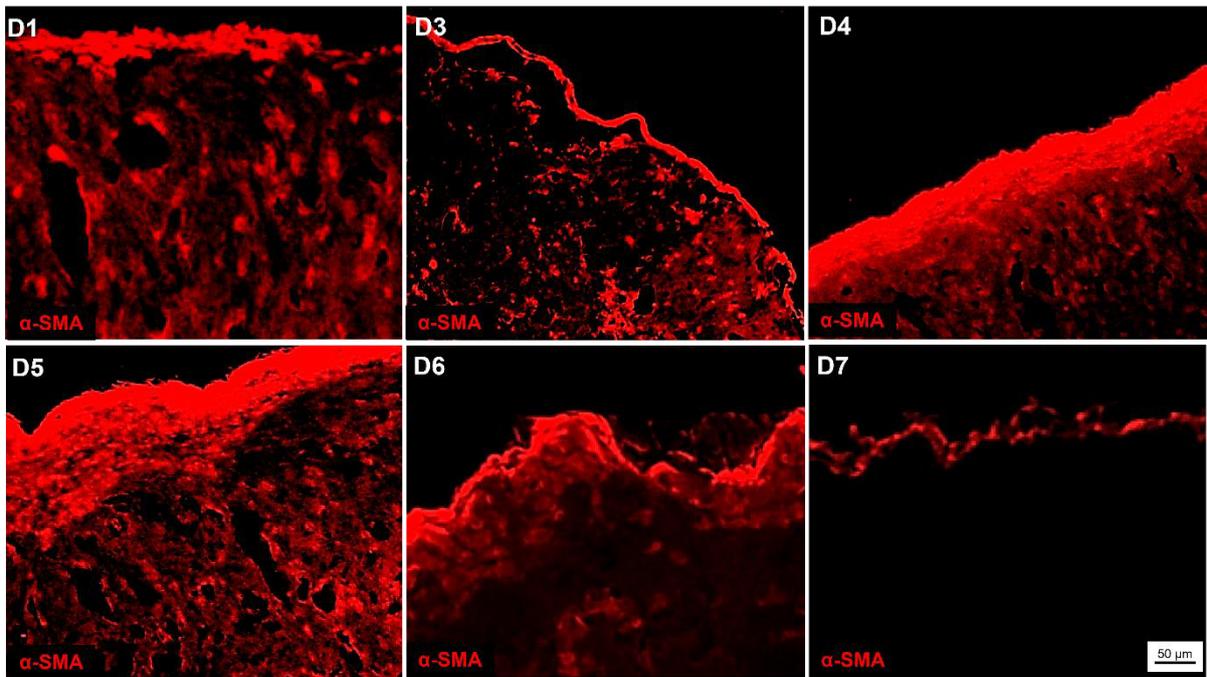


Figure 128 Caractérisation histologique par immunofluorescence après un marquage de l' α -SMA indiquant la présence de myofibroblastes dans le tissu, en fonction des jours de culture, pendant 7 jours. Coupe de 5 μ m, barre d'échelle de 50 μ m.

III.2.2. La microvascularisation : EN4

Afin d'identifier l'organisation fonctionnelle des cellules endothéliales (HUVEC) au sein de nos tissus, nous avons effectué des marquages endothéliaux spécifiques.

L'anticorps anti-EN4 cible les épithéliums vasculaires des micro et macrovaisseaux grâce à la reconnaissance du CD31 (cluster de différenciation 31) présent spécifiquement sur les cellules endothéliales. Nous avons effectué un contrôle positif sur un hydrogel pour identifier la présence des HUVEC juste après l'étape de bioimpression. Sur la Figure 129, le marquage EN4 est identifiable grâce à la fluorescence rouge et nous pouvons constater que les HUVEC sont

de morphologie arrondie à ce stade de maturation. Aucune structure et organisation tridimensionnelle n'est constatée.

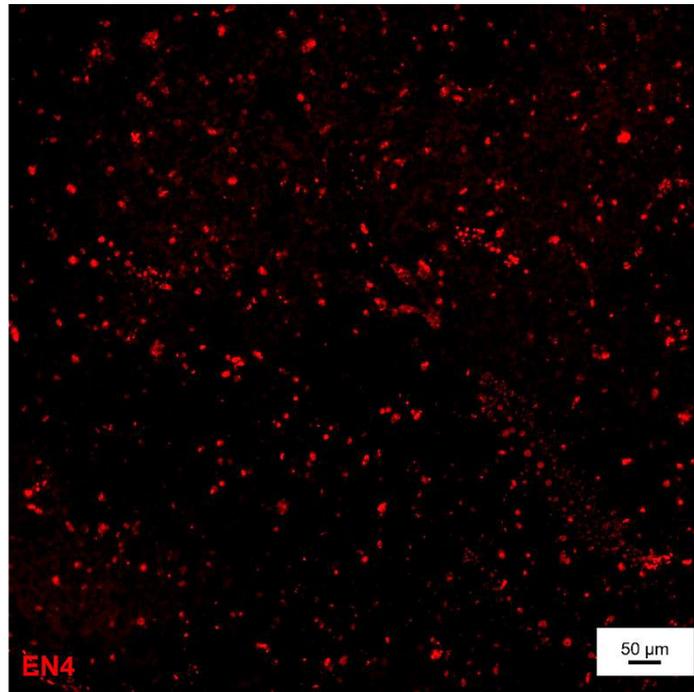


Figure 129 Caractérisation par microscopie de fluorescence du marquage EN4 des HUVEC, directement après bioimpression. Coupe de 10 μm , barre d'échelle 50 μm .

La Figure 130 présente un tissu bioimprimé marqué après 7 jours de maturation. Ces images nous permettent d'observer distinctement la mise en place d'un réseau vasculaire par les HUVEC à l'intérieur de l'hydrogel, identifié par les flèches blanches.

A l'intérieur du tissu, plusieurs organisations sont identifiées, avec des microvascularisations plus épaisses et lâches (Figure 130C) et des zones périphériques formées de microvascularisations plus petites et compactes (Figure 130D). Cette organisation est caractéristique du phénomène d'angiogenèse avec la formation de vaisseaux sanguins puis le développement de nouveaux vaisseaux sanguins de dimensions plus faible à partir de celui-ci²².

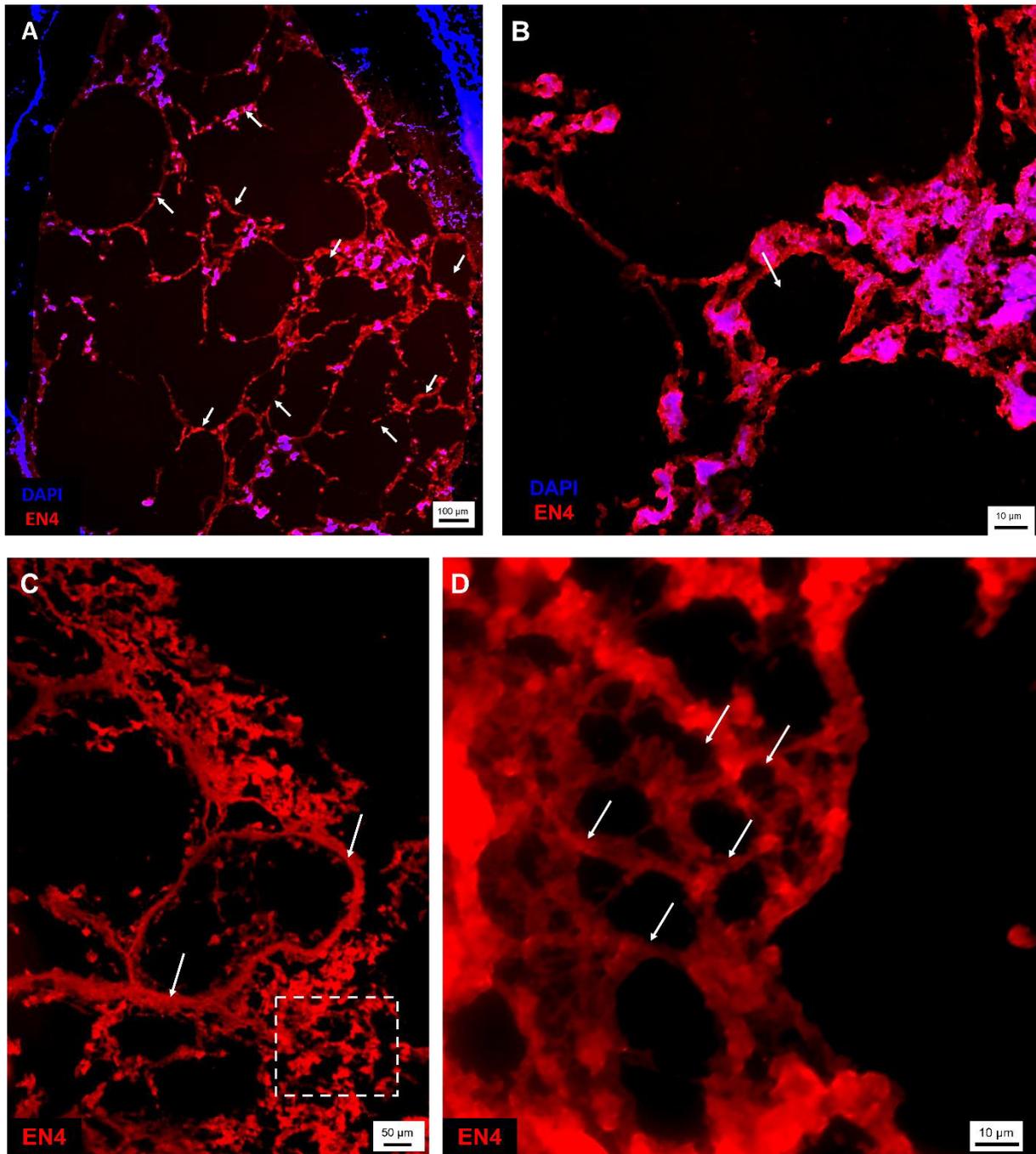


Figure 130 Caractérisation par immunofluorescence d'un tissu vascularisé (flèches) composé de fibroblastes et d'HUVEC après 7 jours de maturation. **(A)** Marquage des noyaux cellulaire par DAPI et des microvaisseaux par l'EN4 (barre d'échelle 100 μm). **(B)** Vue rapproché l'organisation d'un microvaisseau (flèche) (barre d'échelle 10 μm). **(C)** Organisation microvasculaire lâche avec la formation de structures vasculaires épaisses (flèches), et des structures microvasculaires plus dense (zone en pointillée), barre d'échelle 50 μm . **(D)** Organisation microvasculaire dense, aux abords des structures lâches (zone en pointillée dans l'image C) avec des structures vasculaires plus fines (flèches), barre d'échelle 10 μm .

Enfin, nous avons effectué une reconstruction 3D pour nous permettre de visualiser le l'organisation en trois dimensions du réseau microvasculaire à l'intérieur de notre hydrogel. Un marquage EN4 sur une coupe épaisse de 100 μm de notre hydrogel après 7 jours de culture, a été réalisée. Un stack de 32 images a été capturé par microscopie confocale sur une épaisseur de 62 μm . La reconstruction 3D obtenue est présentée sur la Figure 131.

Une image de champ large a été prise avec une vue d'ensemble de l'organisation vasculaire développée dans la coupe de notre hydrogel. Des images plus rapprochées ont ensuite été prises avec des microvaisseaux possédant des diamètres internes d'environ 5 μm .

Cette représentation 3D nous permet d'identifier des réseaux microvasculaires interconnectés, c'est-à-dire des microvaisseaux reliés les uns autres. Cette organisation décrivant la formation de germe vasculaires à partir d'un premier vaisseau sanguin, est un processus complexe et rarement observé en ingénierie vasculaire *in vitro*^{473,474}. Cette organisation de microvaisseaux reliés les uns aux autres est le signe du développement d'un réseau vasculaire fonctionnel et stable.

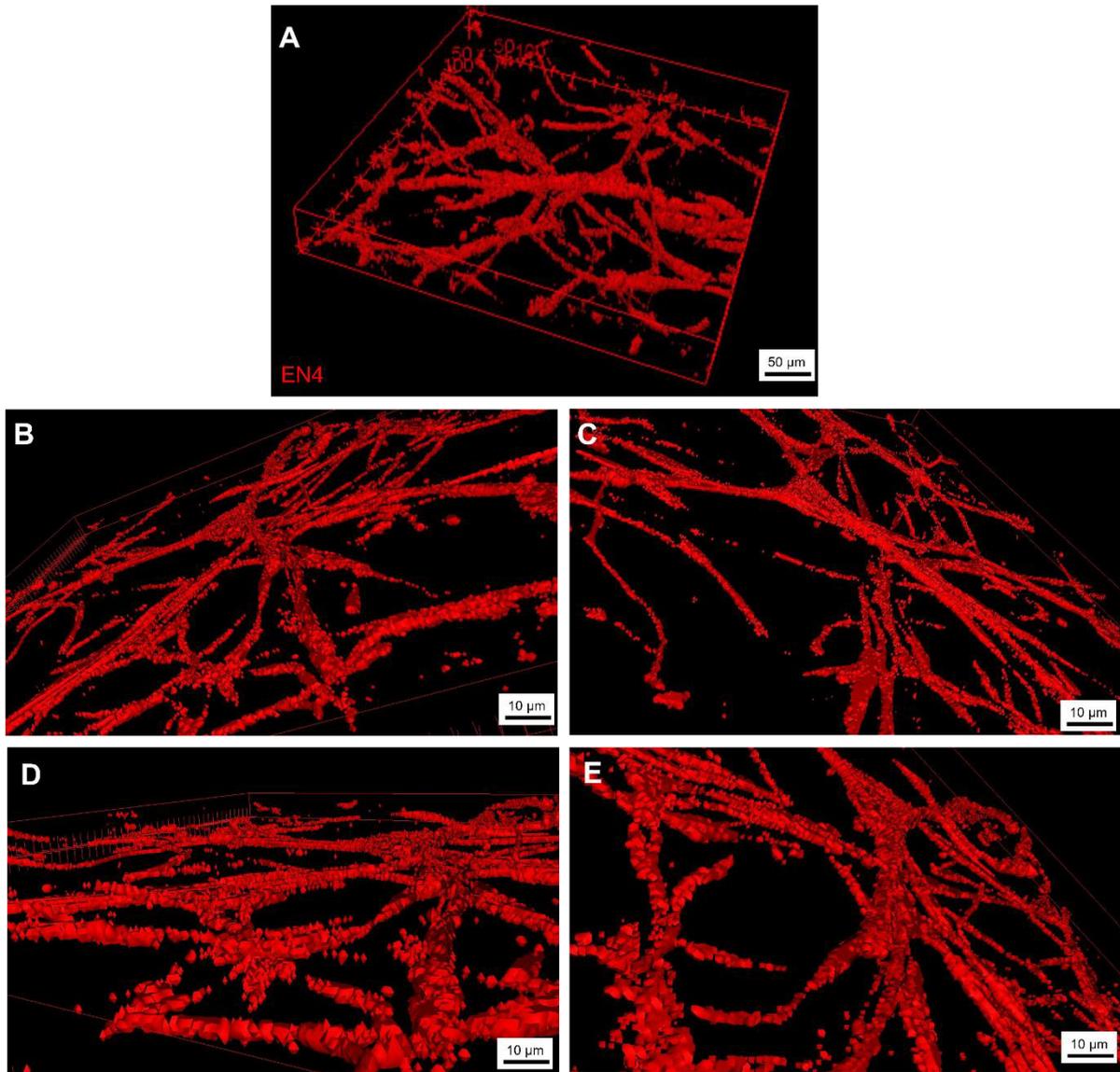
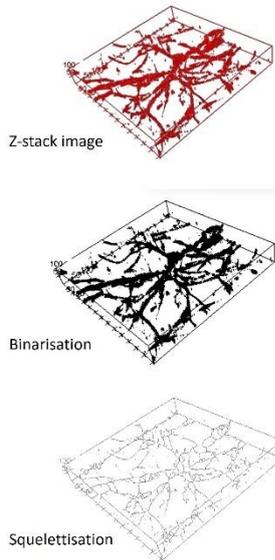


Figure 131 Reconstruction 3D en microscopie confocale d'un réseau vasculaire développé à l'intérieur d'un hydrogel bioimprimé après 7 jours de culture. Z-stack de 32 images sur une épaisseur de tissu de 62 µm. Marquage immunofluorescent à l'EN4. Barre d'échelle 50 µm et 10 µm.

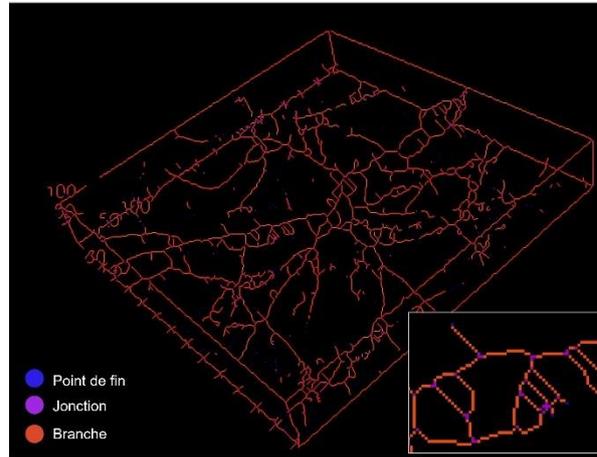
Pour aller plus loin dans l'identification et l'analyse de ce réseau microvasculaire, nous avons quantifié le niveau de branchement des microvaisseaux présents dans notre tissu bioimprimé (Figure 132). A partir de la représentation 3D (Figure 131), une binarisation de l'image permettant de l'avoir uniquement en noir et blanc, est effectuée. A partir de cette nouvelle image, la squelettisation du réseau microvasculaire est représentée (Figure 132A). Grâce à celle-ci, nous pouvons ainsi analyser les branchements observés dans le réseau microvasculaire avec la présence de point-finaux (bleu), de jonctions (violet) et de branches (rouge) (Figure 132B). Enfin nous pouvons observer les différents niveaux de branchement à l'intérieur d'un réseau microvasculaire (Figure 132C), nous permettant d'identifier clairement

l'organisation des cellules endothéliales à l'intérieur de l'hydrogel en un réseau totalement branché de niveau trois. Le tableau présent sur la Figure 132D nous résume le nombre de branches, d'arbres, de jonctions présentes dans le réseau microvasculaire.

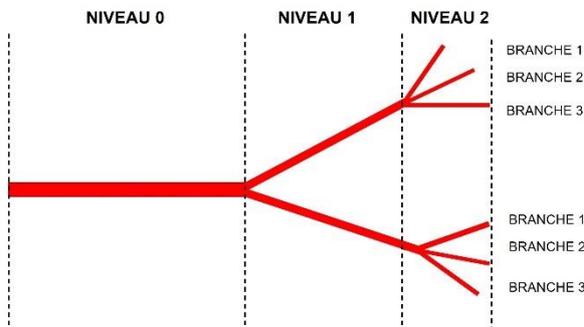
A. TRAITEMENT D'IMAGES



B. ANALYSE DE LA SEGMENTATION



C. NIVEAU DE BRANCHEMENT



D. QUANTIFICATION DES BRANCHEMENTS

Arbres	156
Branches	1038
Jonctions	429
Point-finaux	683
Triple-jonctions	315
Quadruple-jonctions	94

Figure 132 Analyse du niveau de branchement du système microvasculaire organisé à l'intérieur d'un hydrogel bioimprimé après 7 jours de culture. **(A)** Traitement d'image avec une binarisation de la représentation 3D puis une squelettisation de cette image. **(B)** Analyse de la segmentation permettant d'observer les point finaux des vaisseaux (bleu), les jonctions (violet) et les branches (rouge). **(C)** Représentation schématique du niveau de branchement d'un vaisseau sanguin. **(D)** Quantification des branchements observés dans notre réseau microvasculaire à l'intérieur de l'hydrogel 3D.

L'ensemble de ces résultats nous ont permis de démontrer le développement d'un réseau microvasculaire à l'intérieur de nos tissus bioimprimés. Nous allons maintenant identifier la présence possible de structures de type péricytes, jouant un rôle majeur dans la stabilisation de cette microvascularisation.

III.2.3. Les péricytes : NG2

Nous avons réalisé un marquage des péricytes pour identifier leurs présences ou non dans nos tissus bioimprimés. En effet, pour maintenir une microvascularisation à long terme, des cellules stromales vont jouer le rôle de soutien pour ces microvaisseaux. Lors de l'organisation des cellules endothéliales en réseau microvasculaire, les cellules stromales vont s'associer aux microvaisseaux nouvellement formés permettant de stabiliser la structure^{27,28,87,128,140,475}. Les fibroblastes peuvent jouer ce rôle en adoptant un phénotype type-péricyte. Afin d'identifier ces structures, nous avons utilisé un marqueur dirigé contre la membrane cellulaire des péricytes, le marqueur NG2. En fonction du stade de développement du microvaisseau, les péricytes sont identifiables grâce à leur forme arrondies et rattachés directement au microvaisseaux, c'est-à-dire à la paroi membranaire des cellules endothéliales. En effet quand ils viennent d'être recrutés par les cellules endothéliales, ils entrent en contact avec le microvaisseau (forme de protubérance sur la paroi vasculaire), puis au fur-et-à-mesure ils recouvrent la totalité du microvaisseau pour n'être pratiquement plus distinguable de la paroi des cellules endothéliales.

Après 7 jours de maturation, nous avons marqué un tissu bioimprimé composé de fibroblastes et d'HUVEC en co-culture. Sur la Figure 133, nous pouvons identifier un microvaisseau sectionné dans sa longueur. Sur cette image de microscopie de fluorescence, nous pouvons observer le lumen du microvaisseau, de diamètre moyen 5 μm (flèche rouge) mais aussi la présence remarquable du marquage NG2 en vert représentant les membranes des péricytes (flèches blanches). Ils restent cependant difficilement observables car au fur et à mesure du développement du microvaisseau, les péricytes s'allongent autour de celui-ci jusqu'à former une membrane indiscernable de celle des cellules endothéliales par des techniques de microscopie de fluorescence. Le microvaisseau observé sur la Figure 133 est donc en cours de développement.

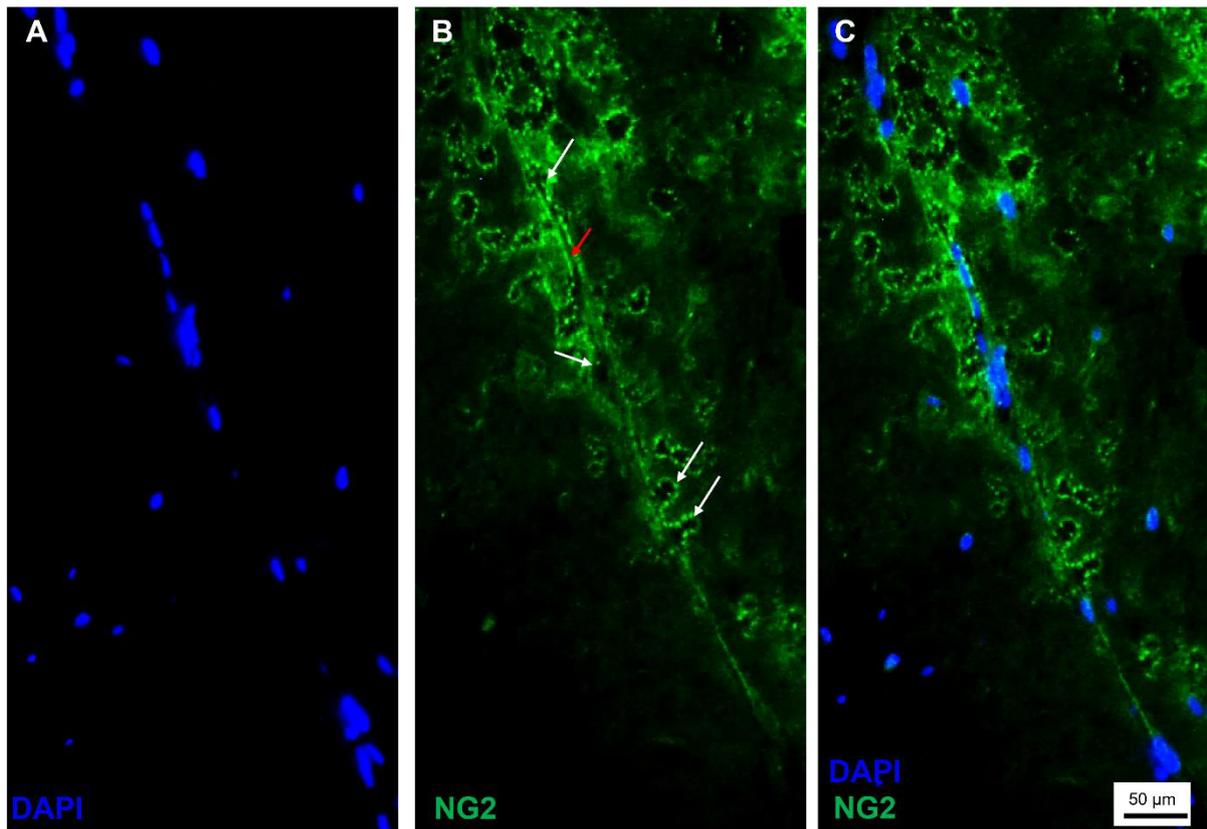


Figure 133 Caractérisation par immunofluorescence des fibroblastes adoptant un phénotype type-péricyte, par marquage NG2 après 7 jours de maturation d'un tissu bioimprimé. **(A)** Marquage DAPI des noyaux cellulaires, **(B)** marquage NG2 des structures types péricytes (flèches blanches) soutenant un microvaisseau coupé dans la longueur avec visualisation de son lumen (flèche rouge), **(C)** superposition des marquages DAPI et NG2. Coupe de 10 µm, barre d'échelle 50 µm.

La Figure 134 démontre la présence de péricytes, cette fois-ci à travers des coupes transversales de microvaisseaux sanguins. Le marquage NG2 nous permet ici d'analyser la présence de péricytes enrobant les microvaisseaux. Sur la Figure 134A, représentant une vue rapprochée d'un microvaisseau coupé de manière transversale, nous pouvons observer les protubérances, caractéristiques des péricytes.

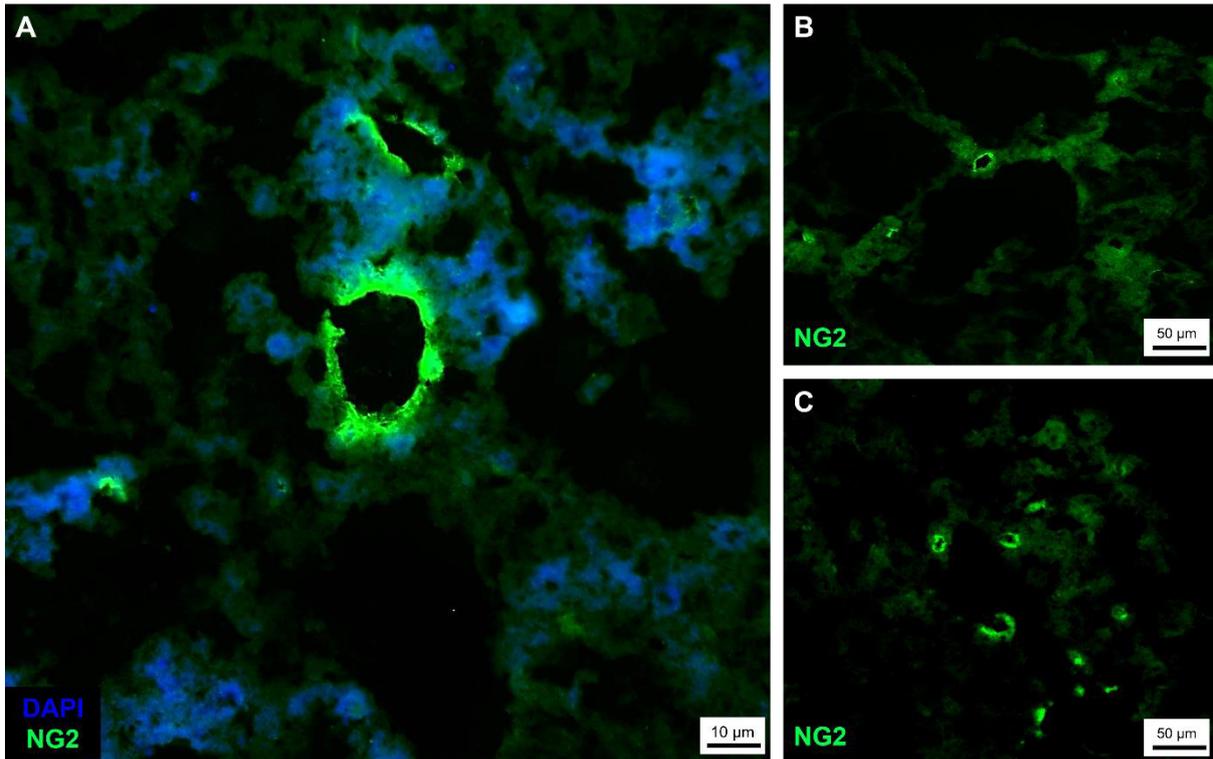


Figure 134 Caractérisation par immunofluorescence des fibroblastes adoptant un phénotype type-péricyte par marquage NG2 après 7 jours de maturation d'un tissu bioimprimé. **(A)** Vue rapprochée d'une coupe transversale d'un microvaisseau avec présence de péricytes sur la totalité de la surface. **(B)** et **(C)** Microvaisseaux avec des zones coupées de manière transversale permettant d'observer la présence de péricytes enrobant différents microvaisseaux. Coupe de 10 μm , barre d'échelle 10 μm et 50 μm .

III.2.4. Conclusions

Grâce aux marquages par immunofluorescence, nous avons pu déterminer une organisation fonctionnelle à l'intérieur des nos tissus bioimprimés composés de fibroblastes et d'HUVEC. Le marquage des filaments d'actine nous a permis de mettre en évidence une organisation temporelle des fibroblastes, activés après bioimpression en un phénotype myofibroblastique. Ceux-ci sont initialement différenciés de manière homogène dans la totalité de l'hydrogel bioimprimé. Ils permettent la dégradation de cet hydrogel pour néosynthétiser une matrice extracellulaire. Pour cela, ils vont migrer à l'intérieur de la totalité de l'hydrogel pour remodeler le tissu jusqu'à atteindre la périphérie du tissu. Une homéostasie s'établit alors avec un phénotype de fibroblastes sénescents majoritaire.

Un marquage EN4 nous a ensuite permis de confirmer que l'organisation structurale des cellules endothéliales correspondait à une organisation microvasculaire. En effet, le marquage

de nos tissus bioimprimés après 7 jours de culture présentent des nombreuses microvascularisations dans la totalité du tissu.

Enfin, un marquage NG2 nous a permis de révéler la présence de péricytes dans nos tissus. Ces péricytes correspondent à une différenciation des fibroblastes, cellules stromales, jouant alors un rôle de soutien des microvaisseaux développés par les cellules endothéliales. Des coupes de microvaisseaux longitudinales et transversales nous permettent d'identifier l'attachement des péricytes sous différentes morphologies.

L'organisation structurelle et fonctionnelle des fibroblastes et des cellules endothéliales ayant été étudiée, nous allons dans la prochaine étude nous intéresser à la néosynthèse matricielle. En effet, nous avons vu que les fibroblastes pouvaient se différencier en myofibroblastes à l'intérieur de notre hydrogel bioimprimé, phénotype permettant la synthèse de matrice extracellulaire nécessaire au développement d'un tissu. La prochaine étude porte donc sur la caractérisation de cette néosynthèse matricielle.

IV. L'ultrastructure tissulaire : matrice extracellulaire

Nous avons vu la formation d'un réseau vasculaire fonctionnel à l'intérieur de nos tissus bioimprimés, grâce à l'organisation en 3D des cellules endothéliales. Nous avons aussi constaté une différenciation des fibroblastes en myofibroblastes, phénotype permettant une néosynthèse de matrice extracellulaire (MEC) grâce aux marquages de l' α -SMA. Nous allons maintenant démontrer cette néosynthèse matricielle en analysant plus particulièrement l'ultrastructure de nos tissus bioimprimés.

IV.1. Contraction tissulaire

Pendant la phase de prolifération, les fibroblastes activés en myofibroblastes, vont digérer l'hydrogel pour néosynthétiser leur propre matrice extracellulaire^{32,77,476}. Lors de cette néosynthèse, les myofibroblastes synthétisent des fibrilles de collagène qui vont par la suite s'organiser en fibres de collagène. Cette organisation va produire un phénomène de

contraction des fibres et par conséquent une contraction généralisée au tissu entier. En plus de l'organisation des fibres, la migration des myofibroblastes dans l'hydrogel entraîne aussi une contraction du tissu car des tractions sur la matrice sont exercées par les cellules en migration. Ce phénomène de contraction tissulaire est un premier élément de caractérisation, facilement observable macroscopiquement au fur-et-à-mesure de la culture.

Plusieurs hydrogels de composition cellulaire différente ont été testés pour mesurer la différence de contraction du tissu et relier ce phénomène à la présence des fibroblastes. Pour cela nous avons bioimprimé des hydrogels de taille identique (10 mm x 10 mm x 1,2 cm) mais composés soit de (i) fibroblastes dans du DMEM, (ii) d'HUVEC dans de l'EGM2, (iii) de fibroblastes et d'HUVEC dans un mélange mixte 1 :1 (DMEM/EGM2) ou (iv) sans cellules dans un mélange mixte 1 :1 (DMEM/EGM2). Nous avons mesuré macroscopiquement la taille des hydrogels juste après bioimpression, après 3 jours de culture et après 7 jours de culture. Les graphiques obtenus en fonction des hydrogels sont représentés sur la Figure 135.

Nous pouvons ainsi constater une contraction tissulaire dans deux conditions : l'hydrogel contenant uniquement les fibroblastes dans le milieu DMEM, avec une surface ayant rétractée de près de 90 % et l'hydrogel contenant une co-culture de fibroblastes et d'HUVEC cultivé dans le milieu mixte (DMEM/EGM2), avec une surface ayant rétractée de près de 80 %. L'hydrogel contenant les HUVEC a subi une contraction quasiment nulle, de moins de 10 % de sa taille initiale. Et l'hydrogel acellulaire n'a été soumis à aucune contraction.

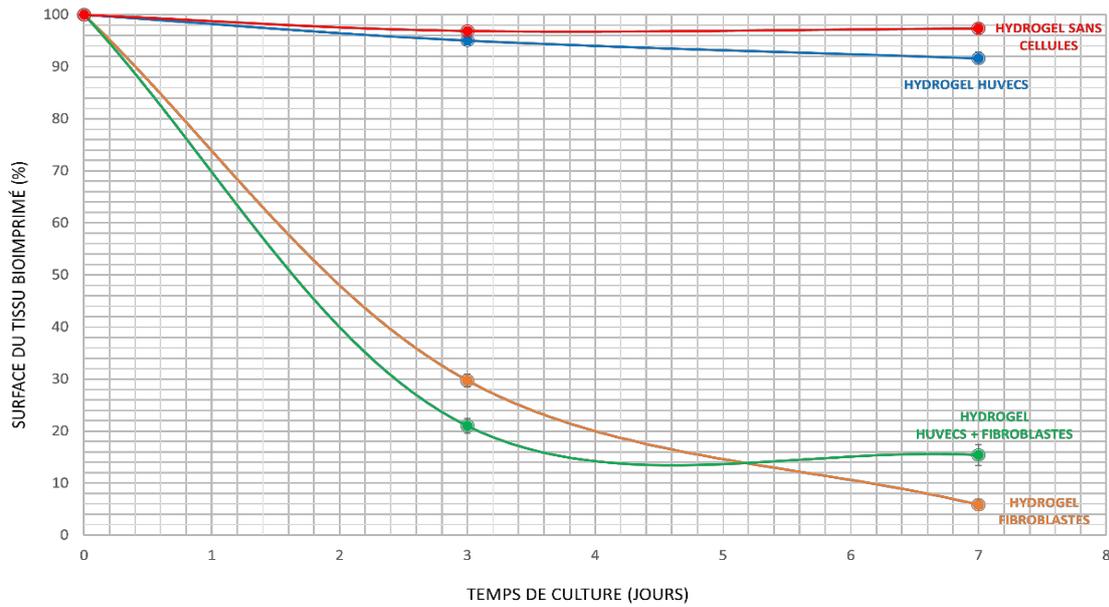


Figure 135 Graphique représentant l'évolution de la surface des différents hydrogels pendant 7 jours de culture. Les courbes de contraction tissulaire d'un hydrogel sans cellules (rouge) cultivé dans du milieu mixte (DMEM/EGM2), d'un hydrogel composé uniquement d'HUVEC (bleu) cultivé dans de l'EGM2, d'un hydrogel composé uniquement de fibroblastes (orange) cultivé dans du DMEM, et d'un hydrogel composé d'une co-culture de fibroblastes et d'HUVEC (verte) cultivé dans un milieu mixte (EGM2/DMEM) sont représentées.

Un changement de morphologie de l'hydrogel est observable ainsi qu'un changement de couleur, passant de rose pâle translucide à blanc opaque après 7 jours de culture (Figure 136). Sur cette figure une contraction et un épaissement de l'hydrogel sont observés. L'hydrogel est ainsi passé d'une taille initiale de 10 mm x 10 mm x 1,2 cm à une taille de 3 mm x 3 mm x 5 mm. Ces analyses macroscopiques tendent à démontrer l'action primordiale des fibroblastes dans le phénomène de contraction tissulaire et donc dans leurs implications à remodeler le tissu *via* une néosynthèse matricielle.

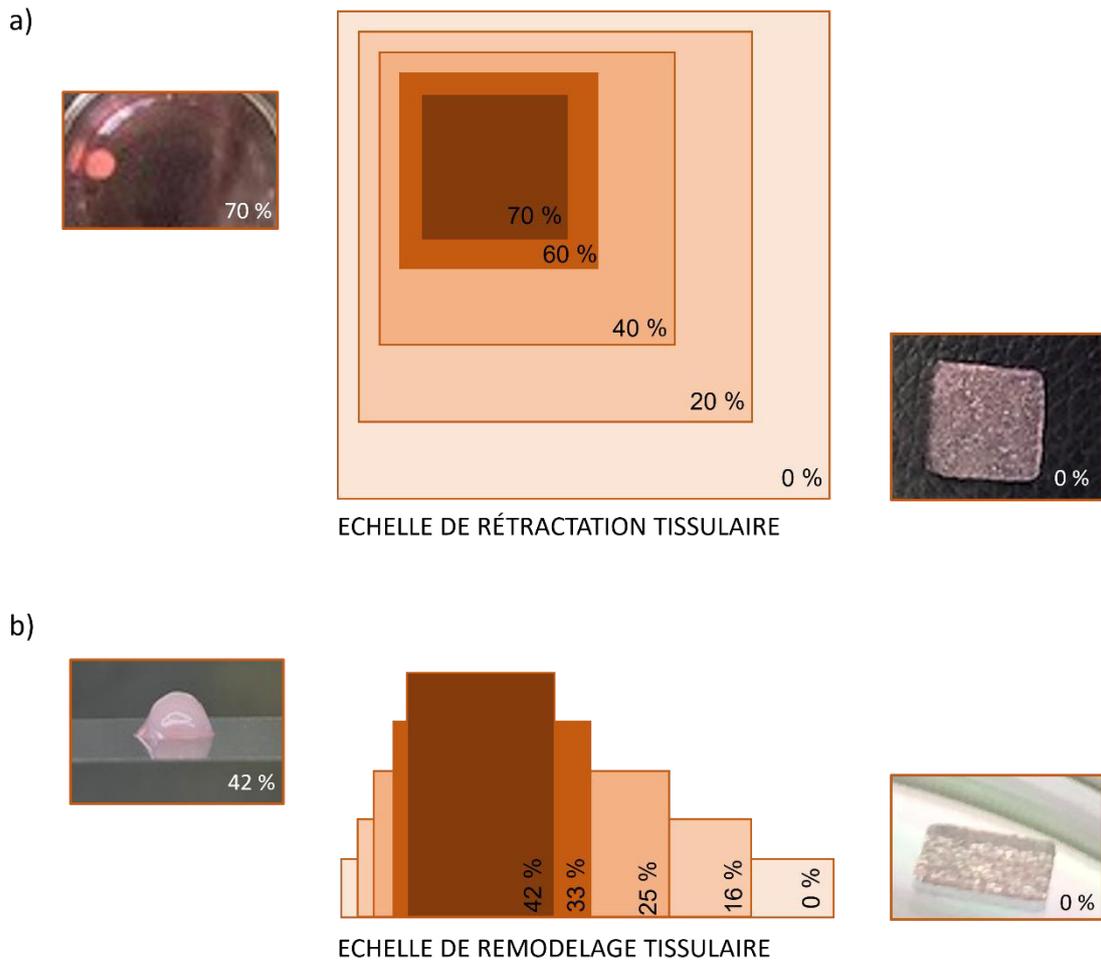


Figure 136 Représentation de la contraction tissulaire observée dans un hydrogel bioimprimé composé de fibroblastes et d'HUVEC après 7 jours de maturation. **a)** Echelle de contraction d'un hydrogel observé de dessus après 7 jours de culture. **b)** Echelle de contraction tissulaire d'un hydrogel observé de profil après 7 jours de culture. Après bioimpression le tissu possède des dimensions de 10 mm x 10 mm x 1,2 mm. Après maturation, le tissu possède des dimensions de 3 mm x 3 mm x 5 mm.

IV.2. Microscopie Electronique à Transmission

Cette technique d'observation va nous permettre de caractériser l'ultrastructure interne de nos tissus, en particulier la présence de matrice extracellulaire.

Comme nous l'avons décrit précédemment, au cours de la formation ou de la reconstruction d'un tissu, trois étapes ont lieu : l'inflammation, la prolifération et la maturation. Lors de la prolifération, les fibroblastes se différencient en myofibroblastes et les cellules endothéliales initient une néovascularisation. Cette étape permet la fabrication d'un tissu que l'on nomme tissu de granulation. Au fur et à mesure de cette phase de prolifération commence la phase

de maturation. Cette étape correspond à la formation du nouveau tissu, c'est-à-dire au remodelage du tissu de granulation. Pendant cette étape, un remplacement du tissu de granulation par du collagène de type I et des fibres élastiques a lieu avec une diminution de la quantité de cellules et une homéostasie matricielle. Une microvascularisation est mise en place en parallèle grâce à cette néosynthèse matricielle par les fibroblastes restant. Cette dernière étape permet d'aboutir finalement à la formation d'un tissu conjonctif mature⁷⁷.

La microscopie électronique à transmission va nous permettre d'identifier la présence de matrice extracellulaire et donc d'identifier le niveau de maturation de notre tissu bioimprimé.

Après 7 jours de maturation, nous avons fixé et analysé un tissu bioimprimé composé de fibroblastes et d'HUVEC. Des coupes ultrafines de 100 nm ont été réalisées dans l'échantillon. Sur la Figure 137A, les flèches rouges indiquent des fibres de collagène produites par les myofibroblastes. Sur la même image, un myofibroblaste est identifiable à côté des fibres de collagène. Une vue plus rapprochée des fibres de collagène (Figure 137B) permet de les identifier plus précisément selon deux points de vue : des fibres de collagène dans le sens de la longueur et des fibres de collagène coupées de manière transversale avec une morphologie arrondie et regroupées. A l'intérieur du tissu bioimprimé, de l'élastine est aussi observée, néosynthétisée par les fibroblastes (Figure 137C). La Figure 137D présente une vue rapprochée d'une fibre de collagène avec l'identification de stries verticales caractéristiques des fibrilles de collagène. La Figure 137E représente un myofibroblaste néosynthétisant des fibrilles de collagène. Enfin, nous avons aussi pu identifier des résidus de bioencre dans quelques zones du tissu (Figure 137F).

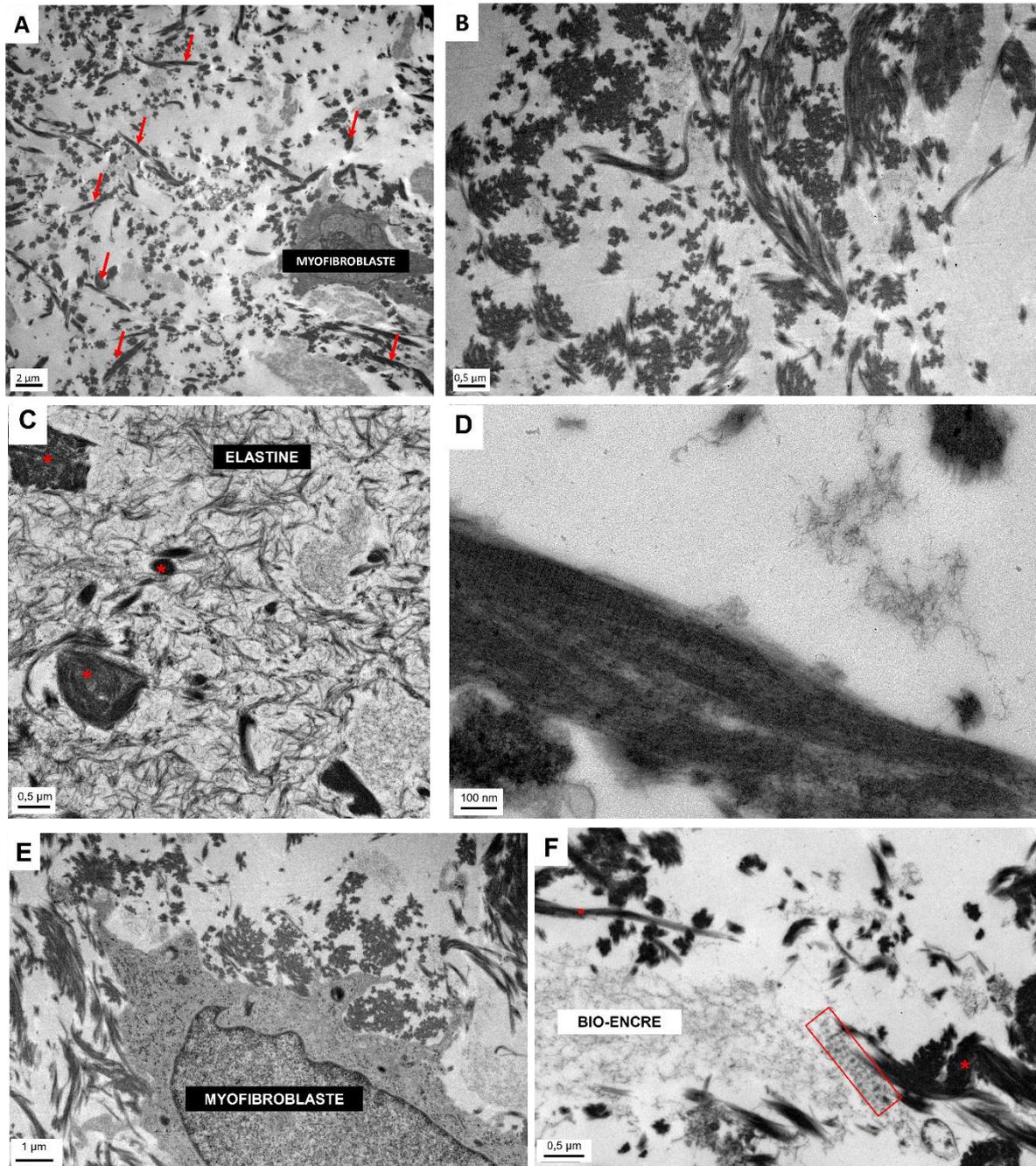


Figure 137 Caractérisation par microscopie électronique à transmission de l'ultrastructure d'un tissu vascularisé après 7 jours de maturation. **(A)** Fibrilles de collagène (flèche rouge) et myofibroblaste, **(B)** fibres de collagène, **(C)** élastine présente dans le tissu, **(D)** fibrille de collagène avec présence de stries sur les microfibrilles de collagène, **(E)** myofibroblaste néosynthétisant de la matrice, **(F)** matrice extracellulaire avec fibre de collagène (rectangle rouge), fibre élastique (astéris rouge) et résidus de bioencre. Coupe de 100 nm. Analyses microscopiques utilisées par Elisabeth Errazuriz-Cerda, ingénieure d'étude en microscopie électronique au Centre d'Imagerie Quantitative Lyon Est (CIQLE).

Ces analyses microscopiques nous ont permis de mettre en évidence la néosynthèse d'une matrice extracellulaire par les fibroblastes activés à l'intérieur d'un hydrogel bioimprimé.

Ceux-ci procèdent alors à une dégradation de la bioencres, encore présentes à certains endroits du tissu, pour synthétiser des fibres de collagène et de l'élastine.

Grâce aux caractérisations par microscopie électronique à transmission, nous avons aussi pu mettre en évidence l'organisation des cellules endothéliales à l'intérieur du tissu. Sur la Figure 138A, une cellule endothéliale est présente et adhère à une matrice de collagène sécrétée auparavant par les fibroblastes ce qui permet d'initier le développement d'un réseau vasculaire. La matrice néosynthétisée est identifiable grâce à la présence de stries composant les microfibrilles de collagène. Les Figure 138B, C et D présentent les jonctions serrées entre les cellules endothéliales, c'est-à-dire les jonctions établies entre ces cellules pour développer des vaisseaux sanguins. Nous pouvons aussi observer que les cellules endothéliales sont ancrées dans une membrane basale continue, d'apparence plus claire et homogène, cruciale pour le développement de la microvascularisation^{22,59}.

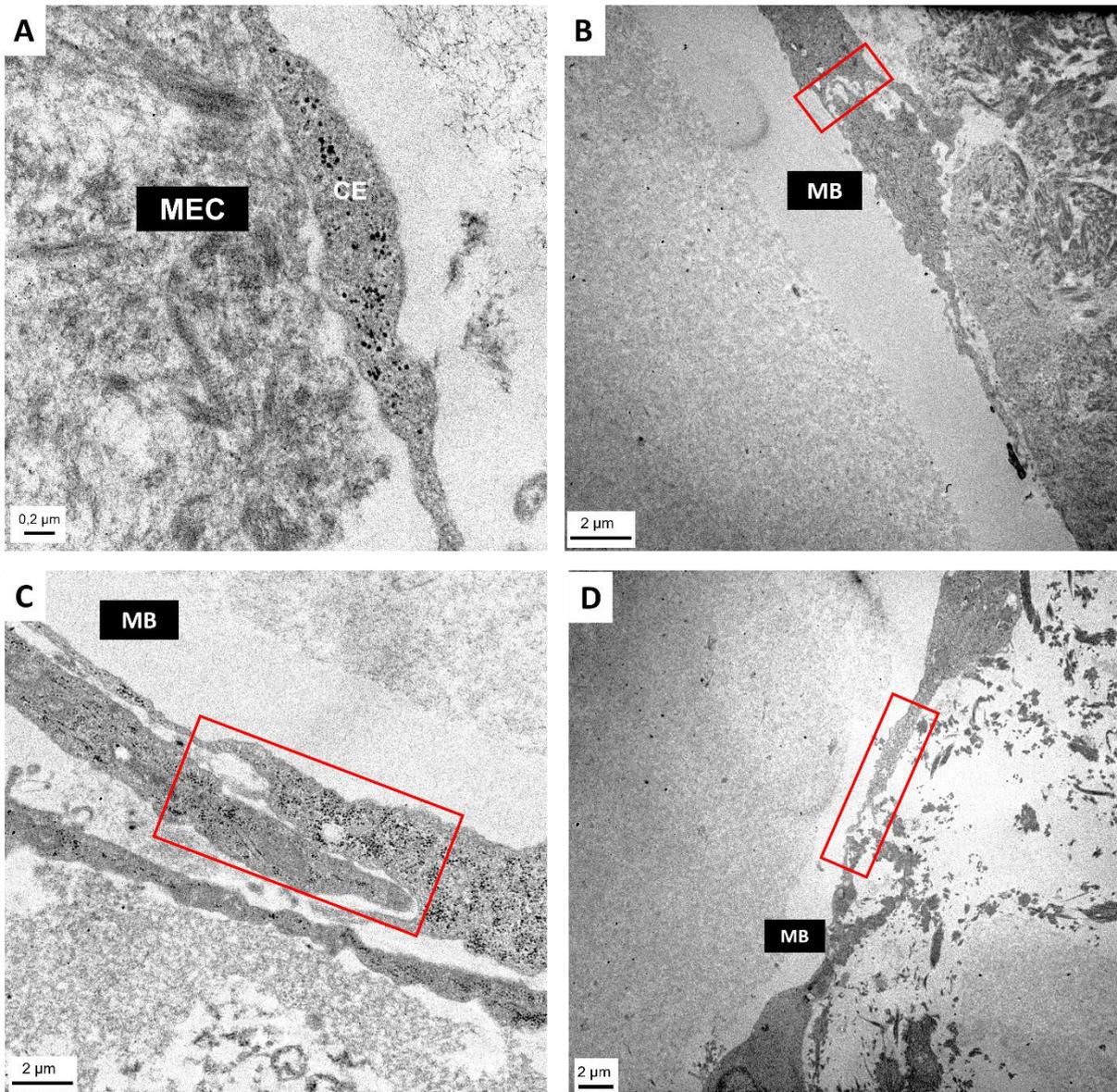


Figure 138 Caractérisation par microscopie électronique à transmission de l'ultrastructure d'un tissu vascularisé après 7 jours de maturation. **(A)** Cellule endothéliale adhérente à la matrice extracellulaire (MEC), **(B)**, **(C)** et **(D)** jonctions serrées entre des cellules endothéliales (rectangle rouge) fixées sur une membrane basale (MB). Coupe de 100 nm. Analyses microscopiques réalisées par Elisabeth Errazuriz-Cerda, ingénieure d'étude en microscopie électronique au Centre d'Imagerie Quantitative Lyon Est (CIQLE).

La microscopie électronique à transmission a permis de mettre en évidence la présence de structures type péricytes. En effet, sur la Figure 139A, nous pouvons observer deux péricytes (P) collés à la membrane d'une cellule endothéliale (CE) pour jouer un rôle de support pour la microvascularisation. De plus, une couche type membrane basale (astéris) est en train d'être formée pour permettre au péricyte d'enrober totalement la cellule endothéliale. Enfin, sur la Figure 139B, nous avons une vue plus générale de l'organisation ultrastructurale du tissu avec

une cellule endothéliale (CE), un péricyte (P), de l'élastine (flèches) et la matrice extracellulaire (MEC).

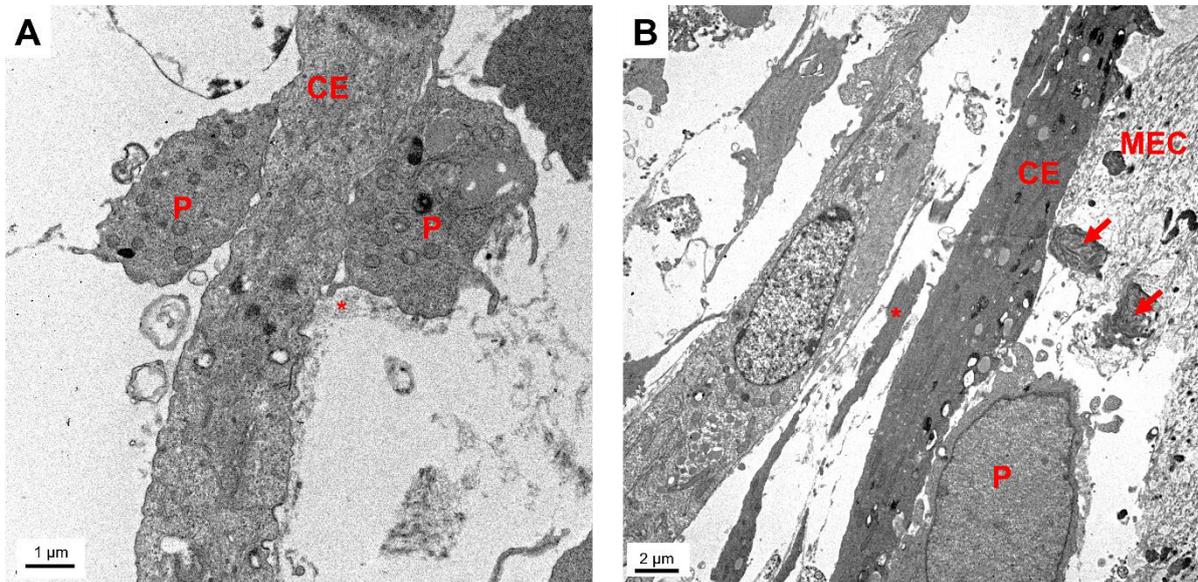


Figure 139 Caractérisation par microscopie électronique à balayage de l'ultrastructure d'un tissu vascularisé après 7 jours de maturation. (A) péricytes (P) adhérents à une cellule endothéliale (CE) avec formation d'une membrane basale (astérisque rouge) englobant le péricyte et la cellule endothéliale, (B) Cellule endothéliale (CE) avec un péricyte (P), et la matrice extracellulaire (MEC) composée d'élastine (flèches rouges). Coupe de 100 nm. Analyses microscopiques réalisées par Elisabeth Errazuriz-Cerda, ingénieure d'étude en microscopie électronique au Centre d'Imagerie Quantitative Lyon Est (CIQLE).

Lors de la formation d'un tissu et notamment durant la phase de maturation qui correspond à un remodelage, le tissu de granulation est en parti remplacé par du collagène de type I et de l'élastine. Les caractérisations que nous avons obtenues nous ont alors permis de mettre en évidence cette maturation. Afin de vérifier la présence de collagène de type I dans nos tissus, nous avons effectué des analyses histologiques.

IV.3. Marquage histologique

Un marquage immunohistologique a été effectué sur nos tissus pour nous permettre de corroborer nos précédents résultats à propos de la néosynthèse de matrice extracellulaire par les fibroblastes, en particulier la synthèse de collagène humain de type I, caractéristique d'un tissu mature. Un marquage du collagène humain de type I a donc été effectué sur un tissu

bioimprimé contenant des HUVEC et des fibroblastes après 7 jours de maturation dans un milieu mixte 1 :1 (DMEM/EGM2).

Un contrôle négatif a été réalisé et est présenté sur la Figure 140A. Sur nos tissus, après 7 jours de maturation, nous pouvons identifier très clairement la présence d'une coloration marron dans l'ensemble du tissu (Figure 140B). Du collagène de type I est alors présent de manière homogène dans tout le tissu. Sur les Figure 140C et Figure 140D nous pouvons constater la présence de fibres de collagène en abondance. Après 7 jours de culture, le tissu possède donc du collagène humain de type I, composant de la matrice extracellulaire synthétisé par les myofibroblastes à l'intérieur de notre hydrogel pour former un tissu fonctionnel.

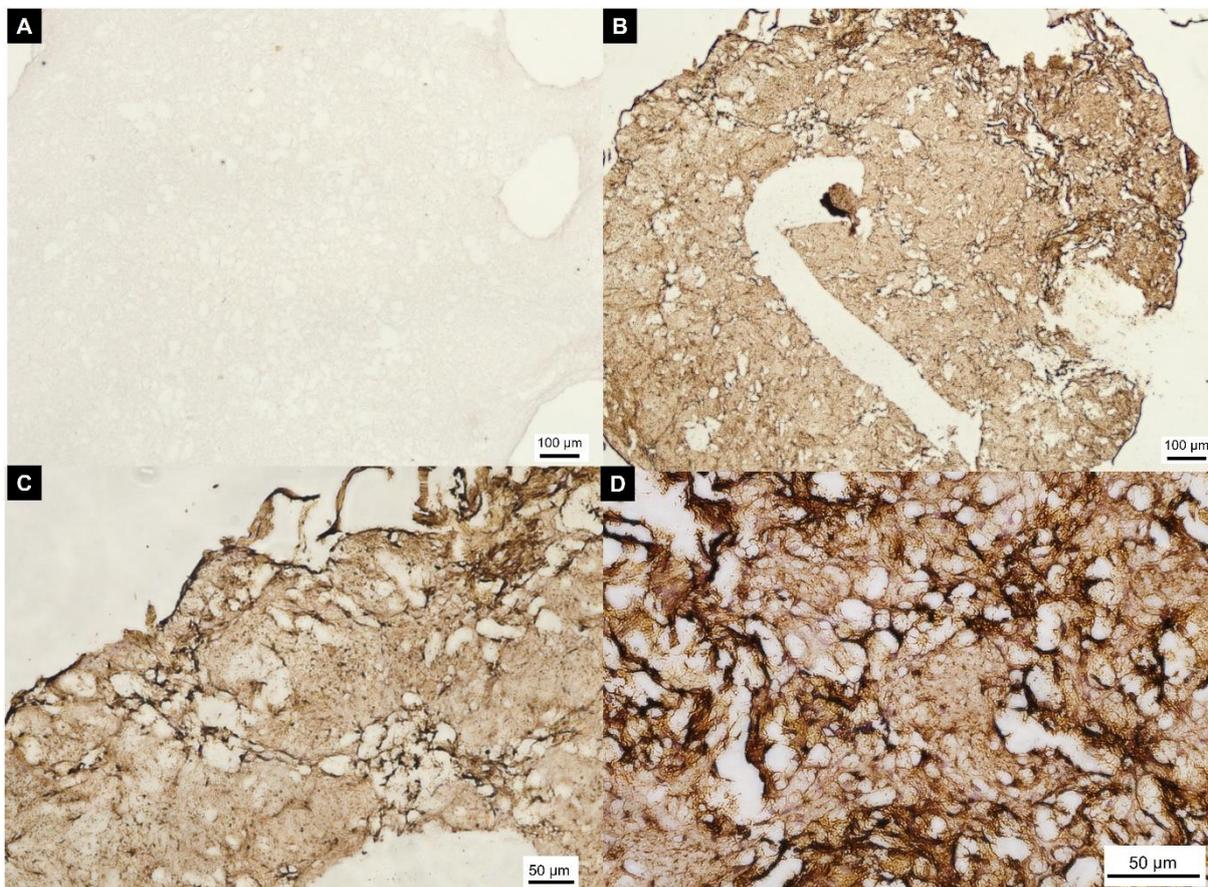


Figure 140 Caractérisation histologique par marquage du collagène humain de type I dans un tissu vascularisé après 7 jours de maturation. (A) Contrôle négatif de la bioencre bioimprimée sans cellule après 7 jours de maturation, (B), (C) et (D) marquage COL1 dans l'ensemble du tissu vascularisé. Coupe de 5 µm, barres d'échelle 100 µm et 50 µm.

IV.4. Conclusions

Nous avons dans un premier temps évalué macroscopiquement la contraction de nos tissus bioimprimés indiquant une activation des fibroblastes pour la néosynthèse matricielle. Un remodelage important a ainsi pu être mis en évidence en 7 jours de culture *in vitro*. Des analyses par microscopie électronique à transmission (MET) nous ont permis de déterminer l'ultrastructure des tissus bioimprimés de manière précise. En effet, après avoir observé la contraction tissulaire de manière macroscopique, c'est avec la MET que nos hypothèses ont été vérifiées. L'organisation et la communication entre les cellules endothéliales, observées en MET, démontre le développement d'un réseau vasculaire à l'intérieur du tissu bioimprimé riche en matrice extracellulaire.

Une communication complexe entre les fibroblastes et les cellules endothéliales est donc à l'origine de cette organisation tissulaire rapide. Des facteurs de croissance sécrétés par ces types cellulaires semblent diffuser à l'intérieur de notre hydrogel pour déclencher le développement, la prolifération et la maturation des cellules.

V. Etudes des facteurs angiogéniques sécrétés dans l'environnement

Afin d'étudier les facteurs sécrétés par les cellules et permettant une organisation tridimensionnelle, nous avons prélevé le surnageant de culture d'un hydrogel bioimprimé contenant des fibroblastes et des HUVEC après 48 heures de culture dans du milieu mixte 1 :1 (DMEMEGM2), c'est-à-dire pendant la phase de prolifération des cellules. Les facteurs présents dans le surnageant ont ensuite été identifiés grâce à un kit semi-quantitatif de détection de 43 protéines humaines impliquées dans l'angiogenèse. Ce kit nous permet de détecter des concentrations faibles de protéines de signalisation cellule-cellule de l'ordre du pg/mL.

Pour cette étude nous avons analysé le surnageant de culture d'un hydrogel bioimprimé et composé de fibroblastes et d'HUVEC. Un essai contrôle composé uniquement du milieu de

culture frais des cellules (DMEM/EGM2) a été réalisé en parallèle. Les échantillons sont déposés sur deux matrices réunissant au total 43 anticorps associés aux 43 protéines humaines d'intérêt impliquées dans le phénomène d'angiogenèse (Tableau 26).

Tableau 26 Liste des 43 anticorps associés aux 43 protéines humaines d'intérêt impliquées dans le processus d'angiogenèse, utilisés lors de l'étude des facteurs solubles sécrétés dans le surnageant de culture, par les cellules dans un hydrogel bioimprimé.

Angiogenin	Angiopoietin-1	Angiopoietin-2	Angiostatin	bFGF
EGF	ENA-78 (CXCL5)	Endostatin	GCSF	GM-CSF
GRO alpha/beta/gamma	I-309 (TCA-3/CCL1)	IFN-gamma	IGF-1	IL-10
IL-1 alpha (IL-1 F1)	IL-1 beta (IL-1 F2)	IL-2	IL-4	IL-6
IL-8 (CXCL8)	I-TAC (CXCL11)	Leptin	MCP-1 (CCL2)	MCP-3 (MARC/CCL7)
MCP-4 (CCL13)	MMP-1	MMP-9	PDGF-BB	PECAM-1 (CD31)
PLGF	RANTES (CCL5)	TGF beta 1	Thrombopoietin (TPO)	Tie-2
TIMP-1	TIMP-2	TNF alpha	uPAR	VEGF-A
VEGFR2	VEGFR3	VEGF-D		

La détection de la présence de ces protéines est effectuée ensuite grâce à une réaction de chimiluminescence observable *via* une caméra CCD. Le fonctionnement de cette méthode est schématisé sur la Figure 141.

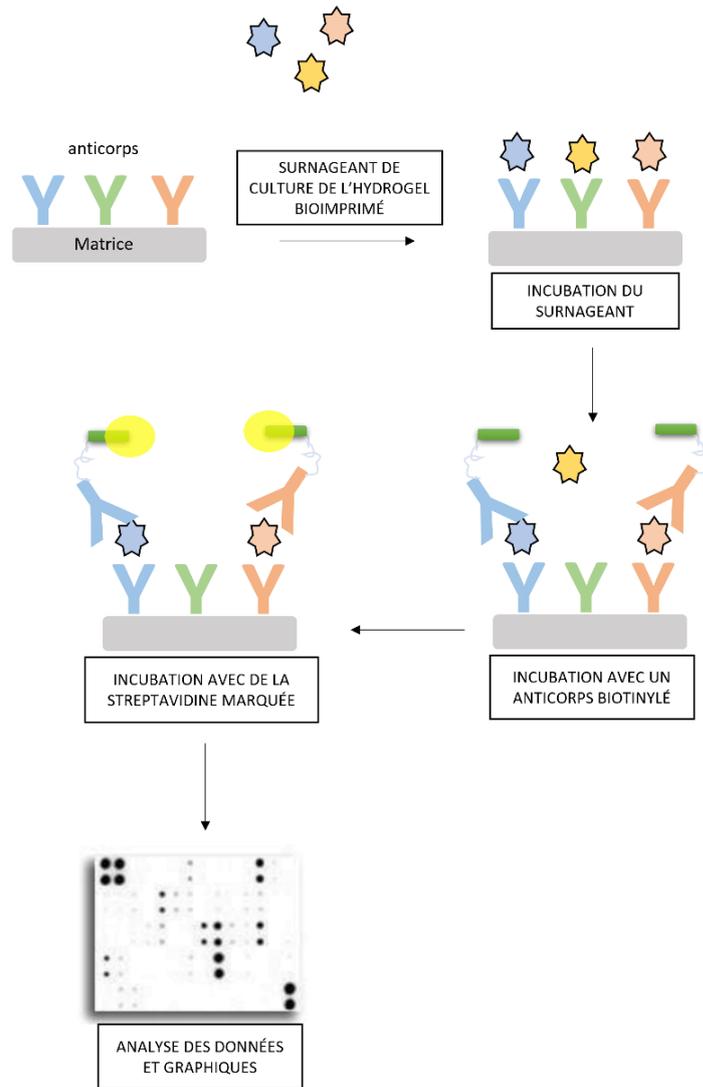


Figure 141 Schéma de principe du fonctionnement de la détection des protéines humaines impliquées dans l'angiogenèse présentes dans le surnageant de culture de tissu bioimprimés.

Sur la Figure 142 sont représentés les résultats de détection par chimiluminescence des protéines angiogéniques présentes en quantité significative dans le surnageant de milieu de culture. Le Tableau 27 et le Tableau 28 représentent les plans des protéines à détecter présentes sur la matrice n°1 et la matrice n°2. Pour chacune des deux matrices, un contrôle avec du milieu de culture frais (DMEM/EGM2) a été effectué.

Tableau 27 Plan de détection des protéines angiogéniques présentes sur la matrice n°1.

PLAN DE LA MATRICE N°1							
Positif	Positif	Négatif	Négatif	Angiopoïétine-1	Angiopoïétine-2	Angiostatine	Endostatine
Positif	Positif	Négatif	Négatif	Angiopoïétine-1	Angiopoïétine-2	Angiostatine	Endostatine
G-CSF	GM-CSF	I-309	IL-10	IL-1 α	IL-1 β	IL-2	IL-4
G-CSF	GM-CSF	I-309	IL-10	IL-1 α	IL-1 β	IL-2	IL-4
I-TAC	MCP-3	MCP-4	MMP-1	MMP-9	PECAM-1	Tie-2	TNF α
I-TAC	MCP-3	MCP-4	MMP-1	MMP-9	PECAM-1	Tie-2	TNF α
uPAR	VEGF R2	VEGF R3	Blanc	Blanc	Blanc	Blanc	Positif
uPAR	VEGF R2	VEGF R3	Blanc	Blanc	Blanc	Blanc	Positif

Tableau 28 Plan de détection des protéines angiogéniques présentes sur la matrice n°2.

PLAN DE LA MATRICE N°2							
Positif	Positif	Négatif	Négatif	Angiogénine	EGF	ENA-78	bFGF
Positif	Positif	Négatif	Négatif	Angiogénine	EGF	ENA-78	bFGF
Gro a/b/c	IFN- γ	IGF-1	IL-6	IL-8	Leptine	MCP61	PDGF-BB
Gro a/b/c	IFN- γ	IGF-1	IL-6	IL-8	Leptine	MCP61	PDGF-BB
PLGF	RANTES (CCL5)	TGF β 1	TIMP-1	TIMP-2	TPO	VEGF	VEGFD
PLGF	RANTES (CCL5)	TGF β 1	TIMP-1	TIMP-2	TPO	VEGF-A	VEGF-D
Blanc	Blanc	Blanc	Blanc	Blanc	Blanc	Négatif	Positif
Blanc	Blanc	Blanc	Blanc	Blanc	Blanc	Négatif	Positif

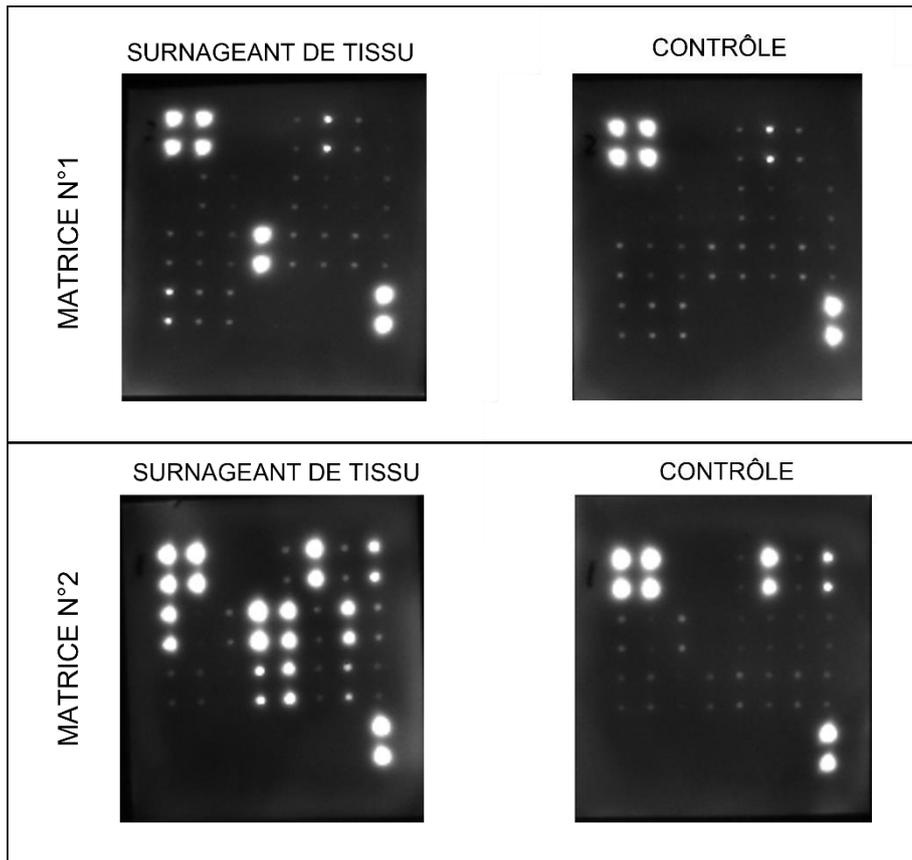


Figure 142 Images par chimiluminescence des deux matrices de détection d'anticorps dirigés contre 43 protéines impliquées dans le processus d'angiogenèse. Détection effectuée dans le surnageant de culture d'un tissu après 48 h de culture et détection effectuée d'un contrôle de milieu de culture frais en absence de cellules. Temps d'intégration du signal de 20 sec.

Grâce à ces images nous avons pu réaliser une analyse semi-quantitative des différentes protéines détectées dans notre surnageant de culture. En effet, l'intensité du signal pour chaque anticorps spécifique est proportionnelle à la concentration d'antigène dans l'échantillon. La comparaison des intensités de signal pour chaque anticorps spécifique à un antigène individuel, entre notre échantillon de surnageant de culture et l'échantillon contrôle de milieu frais, peut ainsi être utilisée pour déterminer les niveaux d'expression relatifs de chaque protéines. Ces différences sont représentées sur la Figure 143.

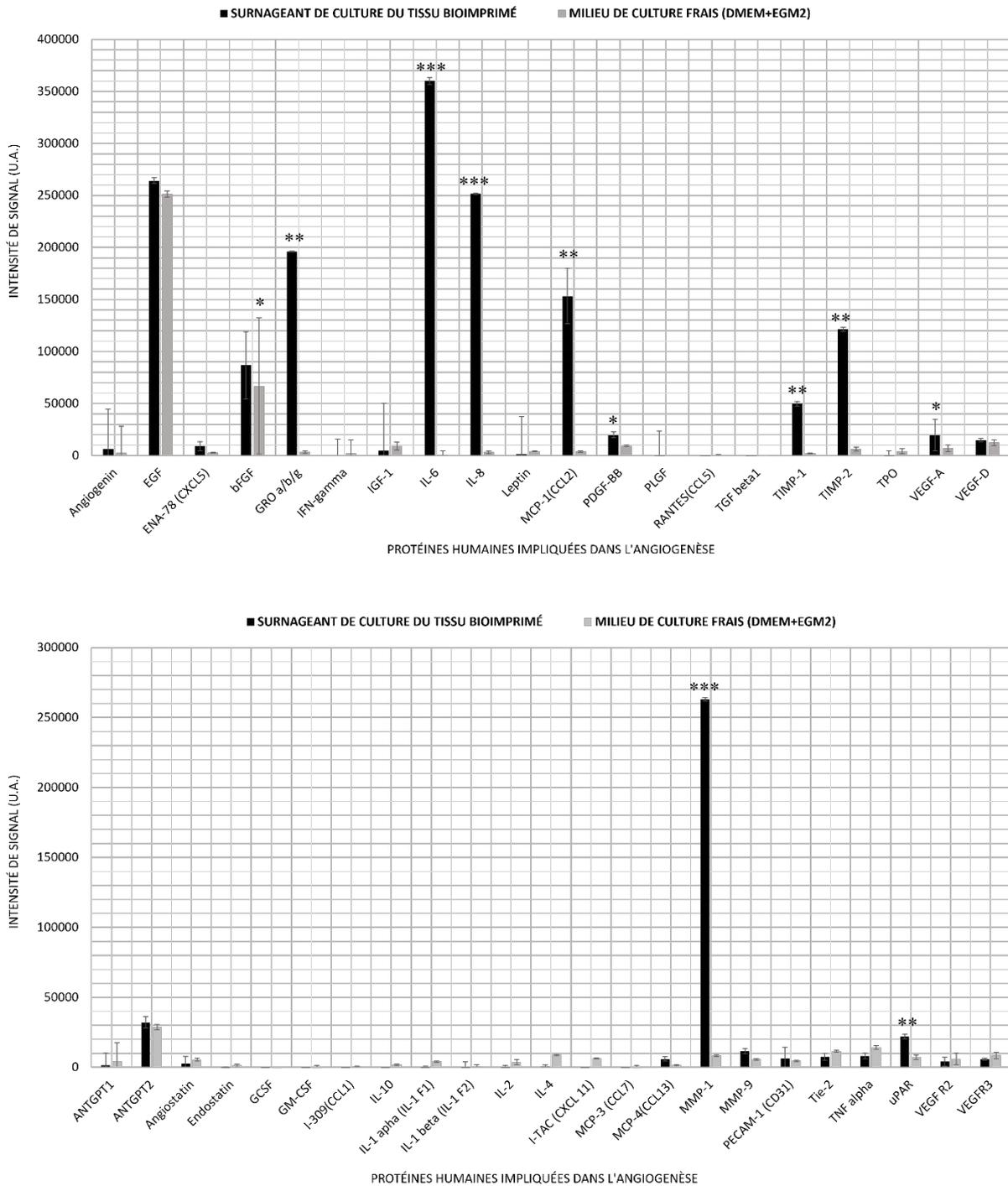


Figure 143 Graphiques représentant l'intensité de signal des anticorps dirigés contre 43 protéines humaines impliquées dans le processus d'angiogenèse à l'intérieur d'un tissu bioimprimé composé de fibroblastes et de cellules endothéliales. Surnageant de culture récolté 48h après bioimpression. Valeur-*p* calculée selon le test t de Welch, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ et ∅ = non significatif.

D'après les deux graphiques présents sur la Figure 143 et représentant les valeurs d'intensités de signal lumineux calculées en fonction des protéines d'intérêt testées, nous pouvons déterminer la présence significativement supérieure au contrôle, de 11 protéines

angiogéniques dans le surnageant de culture d'un hydrogel bioimprimé composé de fibroblastes et d'HUVEC. Ces différentes protéines ainsi que leurs fonctions respectives sont résumées dans le Tableau 29. D'après leurs fonctions, ces différentes protéines peuvent être classées en trois catégories correspondant à trois étapes essentielles de la formation d'un tissu : l'étape d'inflammation avec la sécrétion de signaux permettant aux cellules se trouvant dans l'hydrogel d'activer leur fonctions spécifiques au remodelage d'un tissu ; l'étape de digestion et de néosynthèse matricielle ; et la dernière étape, la néovasculogenèse, c'est-à-dire l'initiation du développement d'une microvascularisation à l'intérieur du tissu. Cette étape de néovasculogenèse se réalise en parallèle à l'étape de dégradation matricielle.

Tableau 29 Résumé des différentes protéines détectées dans le surnageant de culture d'un tissu bioimprimé en cours de remodelage et composé de fibroblastes et de cellules endothéliales.

		NOM DE LA PROTEINE	FONCTIONS
INFLAMMATION ACTIVATION DU REMODELAGE SIGNAUX D'		IL-6 (Interleukine 6)	<p>Cytokine pro-inflammatoire, premier déclencheur de l'angiogenèse et du remodelage tissulaire</p> <p>N'induit pas la prolifération endothéliale, uniquement un rôle de messenger</p> <p>Induit la sécrétion de VEGF⁴⁷⁷</p>
		IL-8 (Interleukine 8)	<p>Chimiokine stimulant le remodelage tissulaire en créant un gradient chimiotactique pour diriger les cellules vers le site à remodeler^{478,479}</p>
		GRO $\alpha/\beta/\gamma$	<p>Chimiokines angiogéniques impliquées dans la formation de vaisseaux sanguins en se fixant sur les cellules endothéliales pour améliorer leur croissance et les diriger</p> <p>Rôle similaire à IL-8⁴⁸⁰⁻⁴⁸³</p> <p>L'ordre de puissance est IL-8 > GROα > GROβ > GROγ</p>

	<p>Chimiokine impliquée dans l'angiogenèse en induisant la sécrétion de VEGF-A qui va à son tour induire la formation de vaisseaux sanguins^{484,485}</p>
<p style="writing-mode: vertical-rl; transform: rotate(180deg);">DIGESTION ET NEOSYNTHESE MATRICIELLE</p>	<p>MMP-1 (Matrix Metalloproteinases)</p> <p>Collagénase permettant de dissoudre la matrice extracellulaire, en particulier le collagène type I, initier et favoriser la formation de vaisseaux sanguins^{486,487}</p>
	<p>uPAR (<i>urokinase Plasminogen Activator Receptor</i>)</p> <p>Acteur essentiel de l'angiogenèse permettant la dégradation de la MEC grâce au complexe plasminogène/plasmine, libérant ainsi des facteurs séquestrés dans cette MEC (bFGF, VEGF)⁴⁸⁸⁻⁴⁹²</p>
	<p>TIMP-1 (<i>Tissue Inhibitor Metalloproteinase</i>)</p> <p>Régule l'activité des MMP Ne ralentit pas la prolifération des cellules endothéliales⁴⁸⁷</p>
	<p>TIMP-2 (<i>Tissue Inhibitor Metalloproteinase</i>)</p> <p>Régule l'activité des MMP Ralentit la prolifération des cellules endothéliales⁴⁸⁷</p>
	<p style="writing-mode: vertical-rl; transform: rotate(180deg);">NEOVASCULOGENESE</p>

VEGF-A (<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>)	Facteur de croissance favorisant les évènements précoces de l'angiogenèse en particulier la migration et la prolifération des cellules endothéliales Induit la sécrétion de MMP-1 ^{487,497}
bFGF (<i>basic Fibroblast Growth Factor</i>)	Facteur de croissance inducteur de l'angiogenèse en améliorant la mitogenèse des cellules endothéliales Formation du tissu de granulation Ré-épithélialisation Remodelage tissulaire ¹⁵

L'angiogenèse est initiée par la liaison de protéines angiogéniques telles que le FGF et le VEGF à leurs récepteurs membranaires spécifiques aux cellules endothéliales. L'une des premières conséquences de ces liaisons et de la stimulation de ces récepteurs est l'activation de métalloprotéases (MMP) et de protéases à sérine. En effet, les MMP de type I sont activées intracellulairement et exportées vers le côté péricellulaire de la membrane plasmique de la cellule endothéliale. Ensuite, environ 30 minutes après la liaison de ces récepteurs se produit l'activation de l'activateur urokinase du plasminogène (uPA), une protéase à sérine qui permet la conversion du plasminogène inactive en plasmine. Celle-ci va activer les MMP qui vont permettre la dégradation de la matrice environnante mais surtout la dégradation de la membrane basale capillaire pour la formation de nouveaux sanguins. Ce cluster MMP1/uPAR à la pointe des cellules endothéliales migrantes contribue à leur capacité à pénétrer et à se déplacer à travers la matrice extracellulaire^{24,463}.

A l'aide de cette étude nous avons pu mettre en évidence la sécrétion de nombreuses protéines angiogéniques dans l'environnement 3D de l'hydrogel bioimprimé, composé de fibroblastes et de cellules endothéliales. Ces résultats démontrent un système de communication et de synthèse complexe mis en place à l'intérieur de notre tissu par les cellules, pour permettre une néosynthèse matricielle, une néovasculogenèse et ainsi aboutir à un remodelage tissulaire.

Ces résultats permettent de plus de confirmer l'activité et la fonctionnalité de nos cellules à l'intérieur de l'hydrogel bioimprimé en faveur d'une reconstruction tissulaire ainsi que d'un développement microvasculaire.

Pour aller plus loin, nous avons ensuite complexifier ce modèle tissulaire vascularisé en ajoutant un troisième type cellulaire essentiel dans le développement et le maintien à long terme de vaisseaux sanguins dans les tissus : les cellules musculaires lisses vasculaires.

VI. Complexification du tissu bioimprimé

Nous avons jusqu'ici co-imprimés des fibroblastes et des HUVEC, nous permettant de développer un tissu conjonctif grâce à la synthèse de matrice par les fibroblastes et le développement d'une microvascularisation à l'intérieur de cette matrice, grâce à l'organisation des cellules endothéliales. De plus, nous avons constaté la présence de fibroblastes à l'abord des microvaisseaux, avec un phénotype de type péricyte pour maintenir le développement de ces microvaisseaux. Il a été démontré que les cellules musculaires lisses, qui sont elles aussi des cellules stromales, jouaient également un rôle de soutien vasculaire dans l'angiogenèse^{28,30,54,140}.

Les cellules musculaires lisses vasculaires jouent donc un rôle important dans la vascularisation. Ce sont des cellules stromales, comme les fibroblastes, permettant de supporter la formation de nouveaux vaisseaux sanguins, aussi bien pour la micro que pour la macrovascularisation. Ils sont donc indispensables pour obtenir *in fine* un tissu vasculaire complexe et fonctionnel stable.

Nous avons donc complexifié notre tissu, en ajoutant un troisième type cellulaire aux fibroblastes et aux cellules endothéliales : les cellules musculaires lisses vasculaires.

VI.1. Environnement de culture optimal

L'utilisation de trois types cellulaires en co-culture dans un même hydrogel nécessite dans un premier temps, de trouver leur environnement de culture optimal. Pour cela nous avons réalisé une étude des différents milieux de culture possiblement utilisables pour ce tissu

cellulaire complexe. Trois milieux de cultures sont initialement utilisés pour les cultures cellulaires en 2D : le DMEM pour les fibroblastes, l'EGM2 pour les HUVEC et le SmGM2 pour les CMLV. Nous avons donc étudié l'impact de 7 mélanges de ces différents milieux de culture sur des hydrogels bioimprimés contenant les fibroblastes, les HUVEC et les CMLV en co-culture. Après 5 jours de culture, les hydrogels ont été marqués par la calcéine AM afin d'observer par microscopie de fluorescence le développement des cellules vivantes à l'intérieur de notre hydrogel bioimprimé.

D'après la Figure 144 nous pouvons remarquer que les cellules semblent se développer de façon similaire dans les 7 différentes conditions de culture. Cependant, une légère différence au niveau de l'architecture de l'hydrogel avec la présence de structures poreuses identifiées notamment pour la culture dans le milieu mixte (SmBM2/DMEM), dans le milieu EGM2 et dans le milieu SmBM2, laisse penser à une possible dégradation de l'hydrogel. Ces conditions de culture seront alors exclues de notre choix.

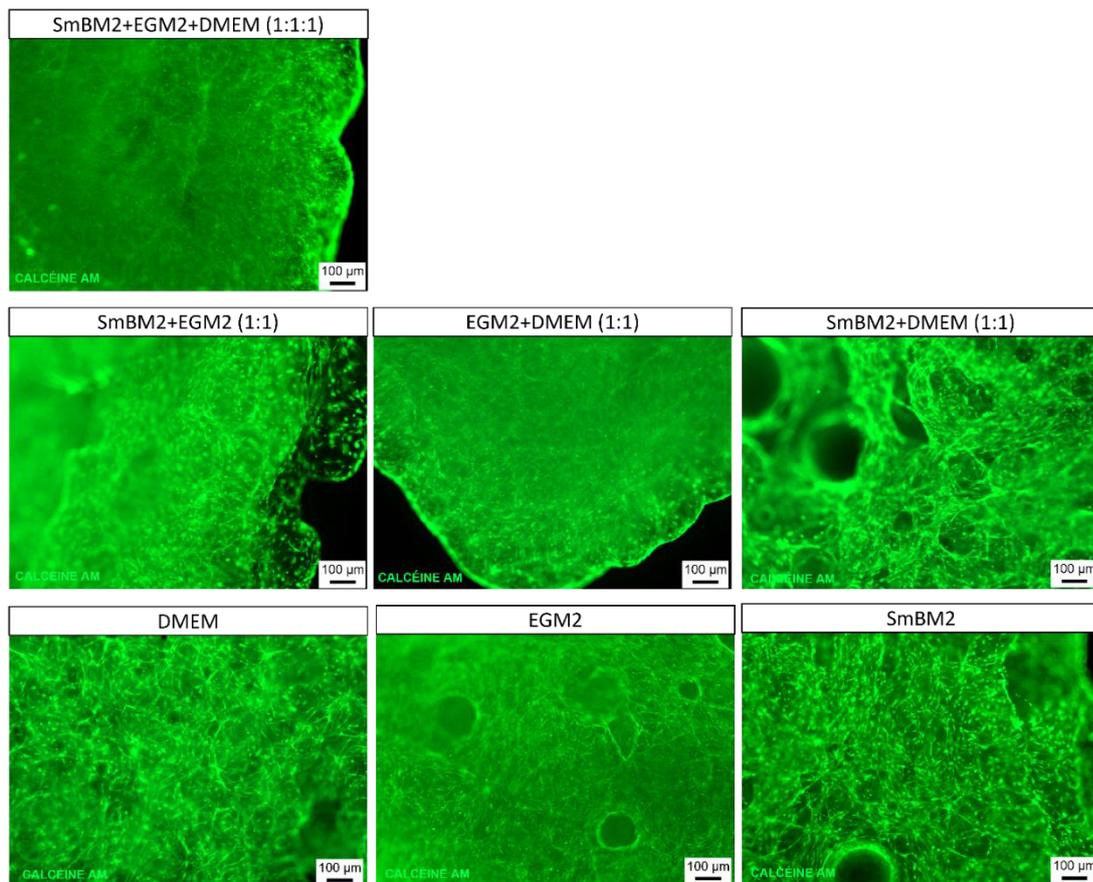


Figure 144 Caractérisation par microscopie de fluorescence après marquage par la calcéine AM de tissus bioimprimés composés de fibroblastes, de cellules endothéliales et de cellules musculaires lisses vasculaires, après 5 jours de culture dans 7 conditions de culture différentes. Barre d'échelle de 100 µm.

A l'aide de cette caractérisation microscopique, aucune différence de croissance ne semble apparente en fonction du milieu de culture utilisé. Cependant, nous ne pouvons pas définir à ce niveau si les trois types cellulaires se sont tous développés de manière identique et s'ils sont toutes encore présents et fonctionnels dans l'hydrogel.

En revanche il est possible de caractériser de manière simple la fonctionnalité des fibroblastes différenciés en myofibroblastes. En effet, comme nous l'avons démontré précédemment, lorsqu'ils sont activés, ils néosynthétisent de la matrice extracellulaire ce qui produit une contraction générale du tissu. Cet effet est visible de manière macroscopique.

VI.2. Contraction tissulaire

Pour étudier si une production de matrice par les fibroblastes activés est présente dans les différentes conditions de culture, nous avons comparé la morphologie des hydrogels. D'après la Figure 145, une contraction du tissu après 5 jours de culture est identifiée pour la condition de culture où trois milieux nutritifs sont mélangés en proportion identique (1 :1 :1). En revanche, aucune contraction des hydrogels cultivés dans les 6 autres conditions de culture n'est constatée. A partir de cette observation, nous allons donc supposer que l'environnement de culture le plus approprié pour un développement et une organisation cellulaire à l'intérieur de notre hydrogel est la condition de culture réunissant les trois milieux dans des proportions identiques (1 :1 :1).

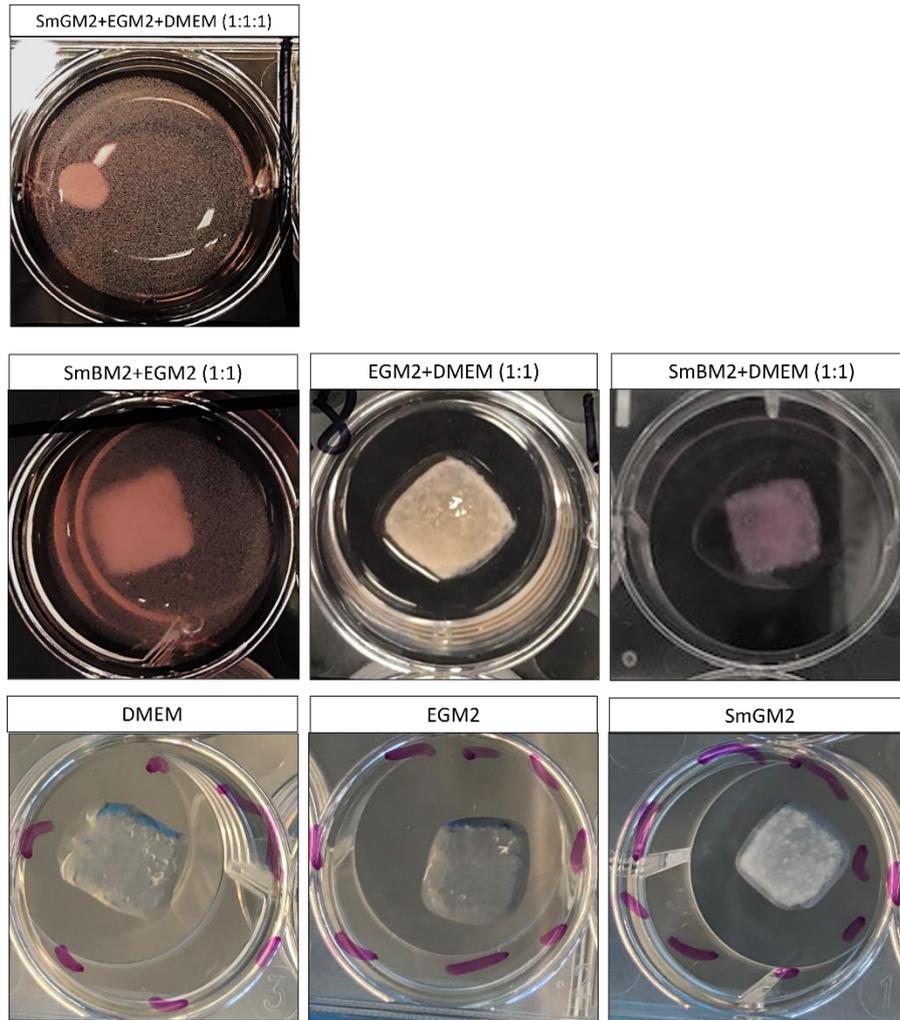


Figure 145 Observation macroscopique de la rétraction tissulaire d'un hydrogel bioimprimé composé de fibroblastes, HUVEC et CMLV après 5 jours de culture, en fonction du milieu de culture utilisé.

Malgré le fait d'observer une contraction tissulaire ainsi qu'un développement des cellules à l'intérieur de l'hydrogel, il n'est pas encore possible de distinguer si les fibroblastes, les HUVEC et les CMLV sont fonctionnels et si les cellules se sont toutes développées de la même manière. Grâce à l'observation de la contraction tissulaire nous pouvons uniquement en déduire une activation des fibroblastes et/ou des cellules musculaires lisses.

Des caractérisations histologiques ont été par la suite réalisées afin d'identifier plus en détail l'organisation cellulaire à l'intérieur de ce tissu complexe composé d'un mélange de fibroblastes, de cellules endothéliales et de cellules musculaires lisses vasculaires.

VI.3. Fibroblastes, HUVEC et CMLV : les communications

Comme lors de l'étude des communications entre les fibroblastes et les HUVEC, nous allons maintenant évaluer les communications entre les HUVEC, les fibroblastes et les CMLV suivant plusieurs organisations dans un hydrogel : les trois types cellulaires séparés dans trois couches d'hydrogel et les trois types cellulaires en co-culture dans le même hydrogel. Tous les hydrogels ont été cultivés dans le mélange de trois milieux nutritifs en proportion identique (DMEM/EGM2/SmBM2).

Pour la première étude dans des couches séparées, nous avons bioimprimé une première couche composée de fibroblastes ($0,25 \cdot 10^6$ cellules/mL), puis une seconde couche composée de CMLV ($1,0 \cdot 10^6$ cellules/mL) et enfin une dernière couche composée d'HUVEC ($1,0 \cdot 10^6$ cellules/mL). Au bout de 7 jours de culture dans le mélange des trois milieux nutritifs, nous avons réalisé un marquage par la calcéine AM des cellules vivantes présentes dans l'hydrogel afin d'identifier leur développement.

D'après la Figure 146, les fibroblastes se sont développés dans la couche d'hydrogel. En revanche, nous pouvons observer que les HUVEC sont toujours vivantes mais présentent une morphologie arrondie. Elles n'ont donc pas développé de structures tridimensionnelles et ne se sont pas organisées. Enfin, il n'a pas été possible, à l'aide de cette technique de caractérisation, d'évaluer le développement des CMLV se trouvant dans la couche centrale de l'hydrogel.

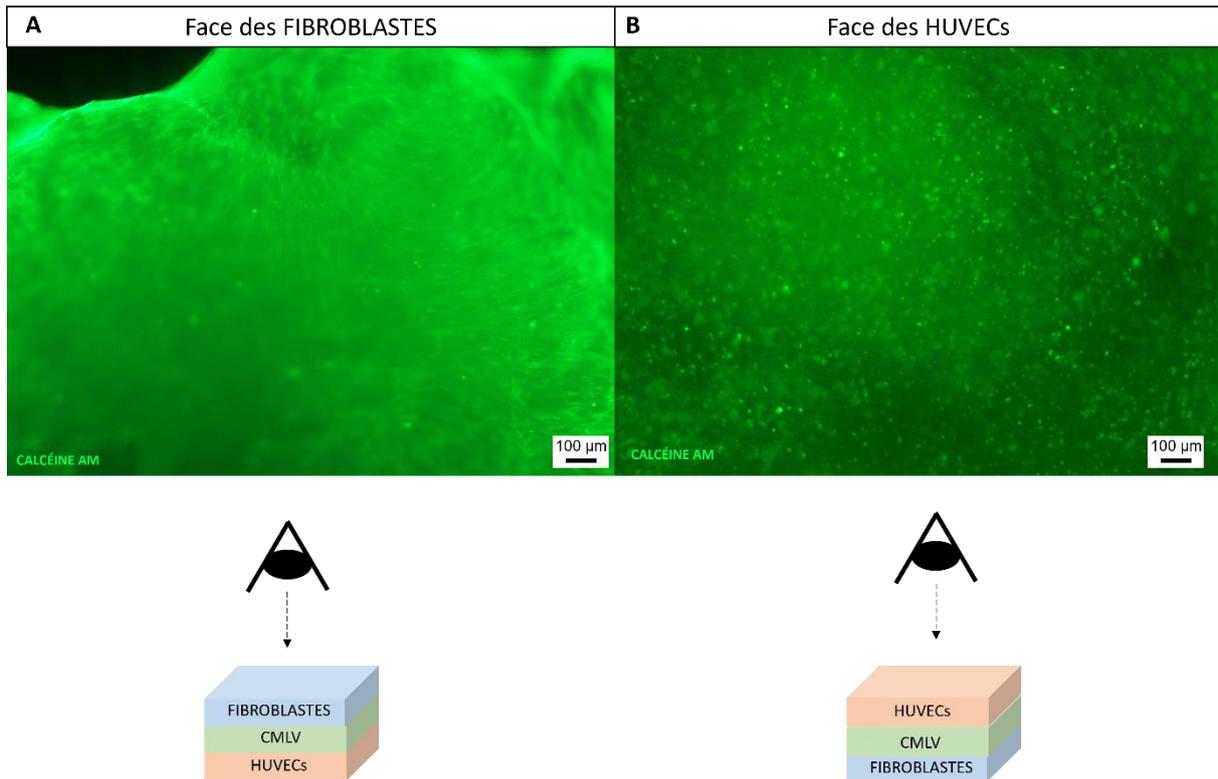


Figure 146 Caractérisation par microscopie de fluorescence après marquage par la calcéine AM d'un tissu bioimprimé composés de trois couches distinctes de fibroblastes, de CMLV et d'HUVEC après 7 jours de culture dans un milieu nutritif mixte (DMEM/EGM2/SmBM2) en proportion identique. **(A)** Observation de la face de de l'hydrogel composée de fibroblastes. **(B)** Observation de la face de l'hydrogel composée des HUVEC. Barre d'échelle 100 μm.

D'après nos précédents résultats, nous savons que les HUVEC s'organisent de manière tridimensionnelle selon plusieurs paramètres :

- Lorsqu'elles sont en co-culture avec les fibroblastes dans le même hydrogel
- Lorsqu'elles sont en co-culture avec les fibroblastes dans deux couches d'hydrogel superposées et dans le même hydrogel
- Lorsqu'elles en culture dans le même environnement qu'un hydrogel de fibroblastes

Dans cette étude, les HUVEC et les fibroblastes sont dans le même hydrogel, dans des couches différentes, mais cette fois-ci séparées par une couche supplémentaire d'hydrogel composée des CMLV. Nous pouvons supposer que les HUVEC ne parviennent pas à s'organiser dans cette configuration du fait soit : de la présence des CMLV, soit de la présence d'une couche d'hydrogel supplémentaire entre elles et les fibroblastes, ce qui pourrait rendre la diffusion

des facteurs solubles limitée, ou soit car le milieu nutritif composé de DMEM/EGM2/SmBM2 ne convient pas aux cellules endothéliales.

Par ailleurs, il a été démontré qu'à partir d'une certaine distance physique dans un hydrogel, et en fonction de la porosité de celui-ci, les HUVEC et les fibroblastes ne parvenait plus à communiquer et plus particulièrement, les facteurs angiogéniques sécrétés par les fibroblastes ne parviennent plus à diffuser jusqu'aux HUVEC pour leur permettre d'initier une vasculogénèse⁴⁶⁴. La diffusion des facteurs angiogéniques et notamment la communication entre les cellules pour aboutir à une organisation cellulaire fonctionnelle, étant un processus très complexe, nous avons choisit de privilégier l'étude de ces cellules lorsqu'elles sont toutes les trois en co-culture dans le même hydrogel, supprimant ainsi les effets possibles de la distance physique entre les cellules et de la présence des CMLV comme barrière entre les deux autres types cellulaires.

VI.4. Développement tissulaire

Pour évaluer le développement d'un tissu complexe composé de fibroblastes, de CMLV et d'HUVEC, nous avons décidé dans cette étude de les bioimprimer dans le même hydrogel afin d'améliorer possiblement les communications intercellulaires.

Pour cela, un hydrogel composé des fibroblastes ($0,25 \cdot 10^6$ cellules/mL), des CMLV ($1,0 \cdot 10^6$ cellules/mL) et des HUVEC ($1,0 \cdot 10^6$ cellules/mL) a été bioimprimé et mis en culture dans un mélange de trois milieux nutritifs : DMEM, EGM2 et SmBM2 (1 :1 :1)

VI.4.1. Microscope optique

Dans un premier temps, nous avons observé par microscopie optique à lumière visible le développement cellulaire à l'intérieur de l'hydrogel. D'après la Figure 147, une différence majeure de structures est observée entre l'hydrogel après bioimpression et l'hydrogel après 5 jours de culture. En effet, une organisation de cellules est visible après 5 jours de culture (indiquée par des flèches blanches). Ces structures nous laissent penser à un développement microvasculaire.

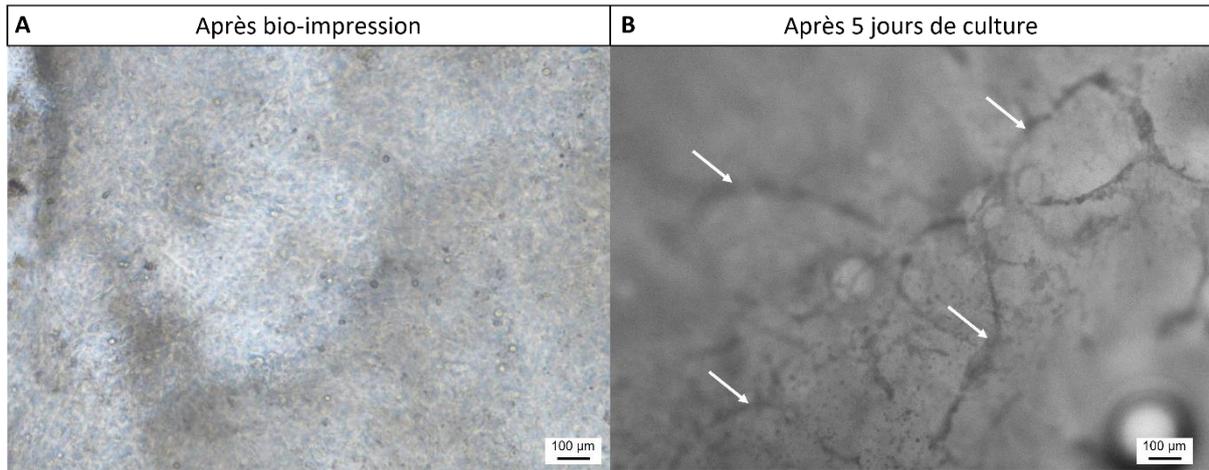


Figure 147 Caractérisation par microscopie optique en lumière visible d'un hydrogel contenant une co-culture de fibroblastes, de CMLV et d'HUVEC cultivé dans un milieu nutritif mixte DMEM/EGM2/SmBM2 (1 :1 :1). **(A)** Hydrogel directement après bioimpression, **(B)** hydrogel après 5 jours de culture. Des structures ressemblant à des microvascularisations sont identifiées par les flèches blanches.

VI.4.2. Coloration Hématoxyline et Eosine

Une coloration standard par l'hématoxyline et l'éosine a été effectuée sur nos tissus afin d'identifier plus clairement l'organisation des cellules à l'intérieur de notre hydrogel (Figure 148). Celle-ci nous confirme la présence d'un réseau cellulaire organisé traversant tout l'hydrogel. Des structures continues de type microvasculaire (flèches noires) apparaissent distinctement. Des cellules sont présentes de manière homogène dans l'ensemble de l'hydrogel avec la formation d'une couche superficielle sur toute la périphérie du tissu, identique à celle observée lors de la culture de fibroblastes seuls dans l'hydrogel.

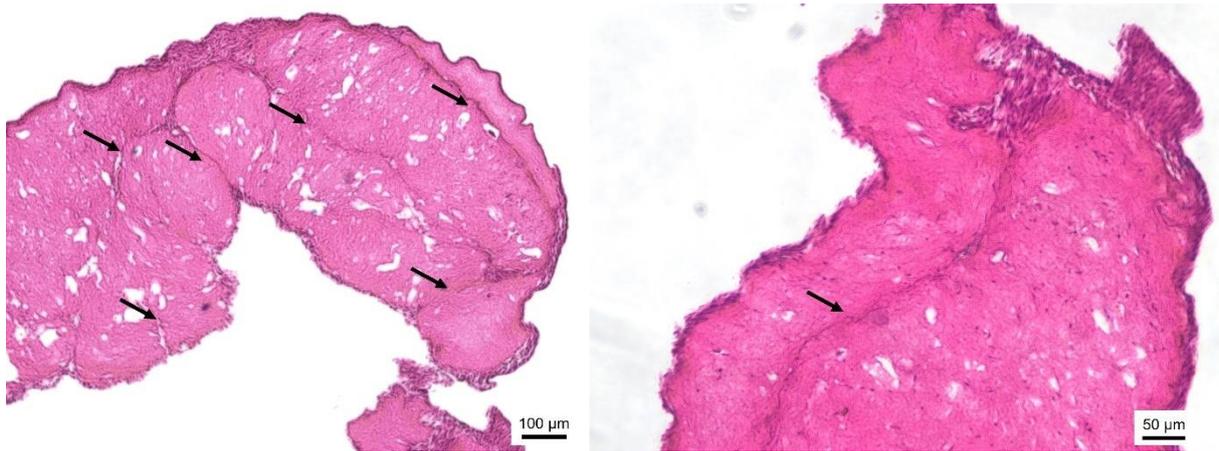


Figure 148 Caractérisation histologique par l'hématoxyline et l'éosine d'un hydrogel complexe composé de fibroblastes, d'HUVEC et de CMLV après 5 jours de maturation. Les flèches noires indiquent des structures tridimensionnelles continues traversant tout l'hydrogel. Coupe de 5 µm, barres d'échelle de 100 µm et 50 µm.

VI.4.3. Coloration Trichrome de Masson

Une coloration par le Trichrome de Masson après 5 jours de culture a été effectuée sur l'hydrogel afin de déterminer la présence de matrice extracellulaire synthétisée par les fibroblastes. Une coloration bleu/verte est bien présente, signe d'une néosynthèse active de collagène par les myofibroblastes (Figure 149). Sur ces images nous pouvons de plus identifier des structures continues et réparties dans l'ensemble de l'hydrogel. Ces structures semblent former des microvaisseaux, bien plus denses par rapport aux structures vasculaires développées précédemment dans nos tissus composés d'une co-culture d'HUVEC et de fibroblastes. Nous pouvons aussi constater que les colorations verte/bleu sont très intenses au niveau de ces structures de type vasculaire.

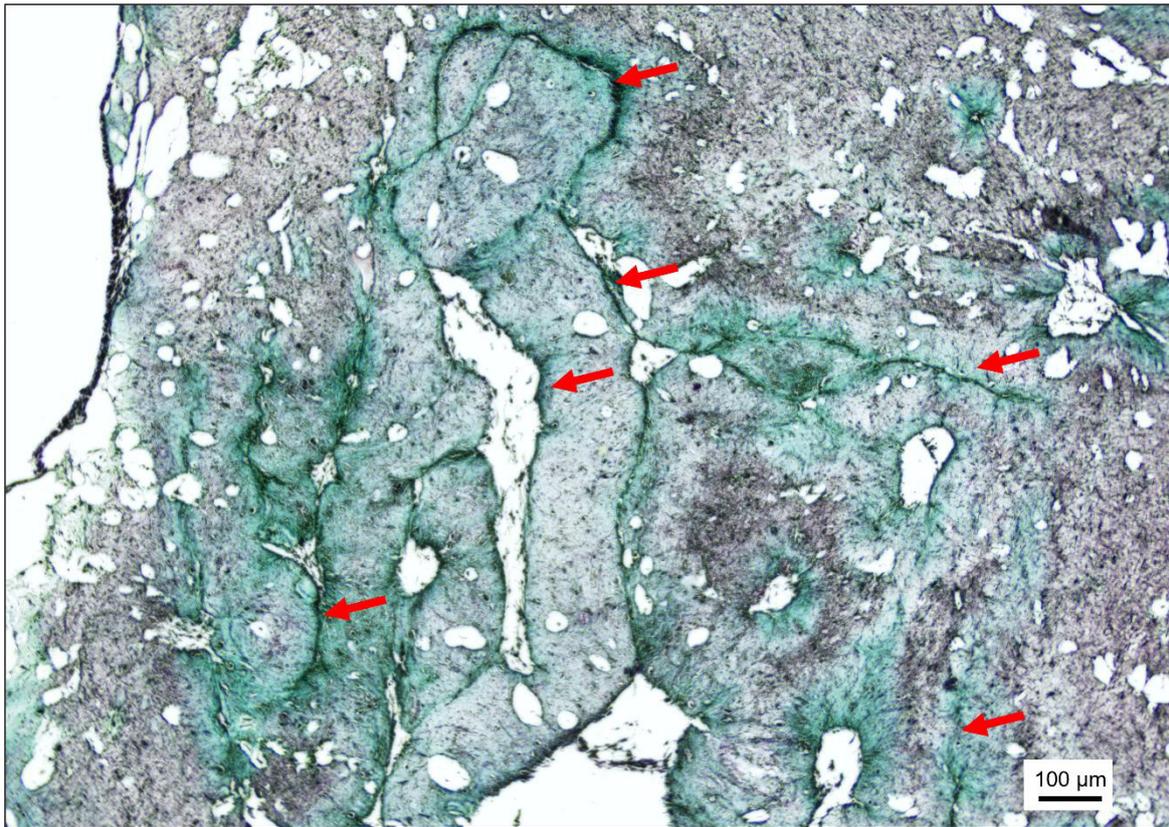


Figure 149 Caractérisation histologique par le Trichrome de Masson d'un hydrogel complexe composé de fibroblastes, HUVEC et CMLV après 5 jours de maturation. Des structures vasculaires (flèches rouges) continues sont observées dans l'ensemble du tissu avec une production de matrice extracellulaire très dense (coloration verte/bleue). Coupe de 5 µm, barre d'échelle de 100 µm.

VI.4.4. Marquage EN4

Enfin une caractérisation par marquage immunofluorescent a été effectuée afin de déterminer le développement fonctionnel d'un réseau vasculaire par les cellules endothéliales.

Nous avons donc effectué un marquage EN4 sur nos tissus pour s'assurer de la création d'un réseau vasculaire. Effectivement, comme l'indique la Figure 150, les structures continues observées sur les précédentes colorations H&E et TM, correspondent bien à une organisation microvasculaire par les cellules endothéliales dans notre hydrogel après 5 jours de culture.

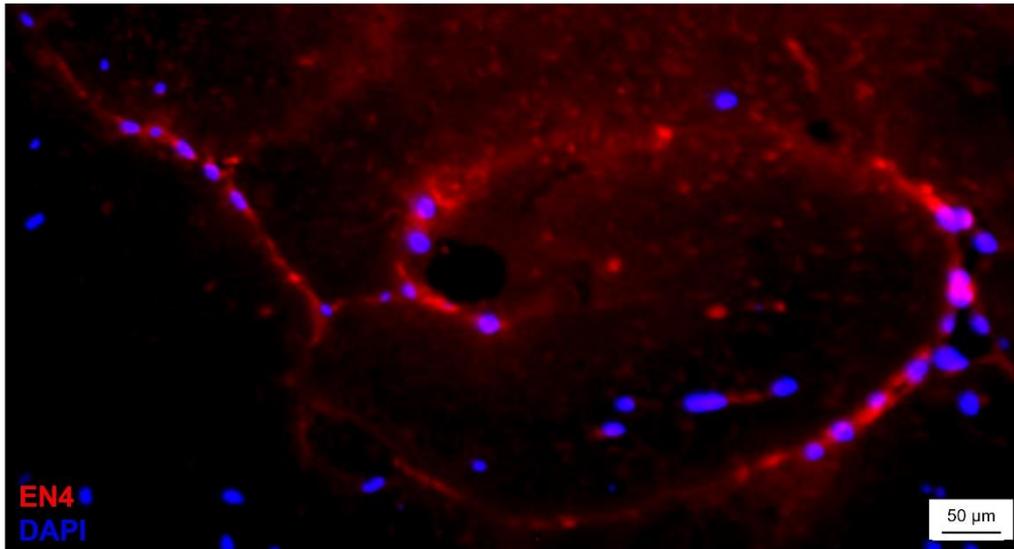


Figure 150 Caractérisation par immunofluorescence d'un hydrogel bioimprimé composé de fibroblastes, de CMLV et d'HUVEC après 5 jours de culture. Marquage des noyaux en DAPI (bleu) et des structures vasculaires par l'EN4 (rouge). Coupe de 10 μm , barre d'échelle 50 μm .

VI.5. Conclusions

Durant cette dernière étude, nous avons complexifié notre hydrogel initialement composé de fibroblastes et d'HUVEC, en ajoutant un troisième type cellulaire : les cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV). Nous avons étudié les communications cellulaires entre ces différentes cellules et l'impact sur leur développement en les positionnant dans des couches séparées à l'intérieur d'un même hydrogel. Dans cette condition de culture, aucune microstructure n'était développée par les HUVEC. Plusieurs causes sont alors possibles : (i) la présence des CMLV entre les fibroblastes et les HUVEC, (ii) la distance physique entre les fibroblastes et les HUVEC ou encore (iii) la condition de culture dans le mélange de milieux nutritifs (EGM2/DMEM/SmBM2). Les facteurs influençant le développement tissulaire étant nombreux et complexe, nous avons ainsi étudié le développement d'un tissu vascularisé dans un hydrogel contenant les trois types cellulaires mélangés.

Nous avons ainsi pu mettre en évidence que lorsque les fibroblastes, les CMLV et les HUVEC sont en co-culture dans le même hydrogel, un réseau microvasculaire semble s'être développé. Les microstructures observées sont plus épaisses et moins nombreuses dans

l'ensemble de l'hydrogel. Nous pouvons comparer cette organisation avec celle observée lors de la co-culture des fibroblastes et des HUVEC dans un hydrogel 3D (Figure 151).

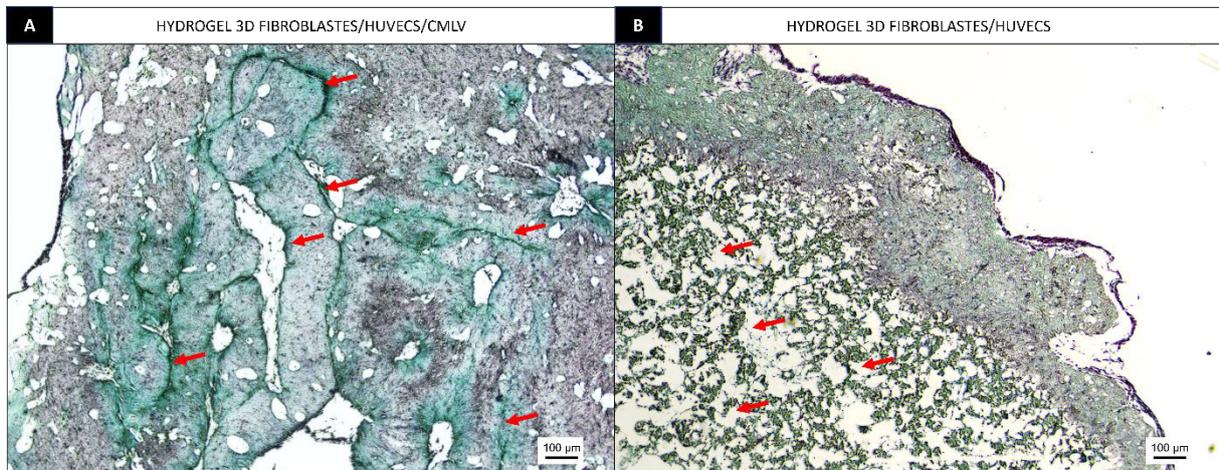


Figure 151 Comparaison de l'organisation microstructurale (flèches rouges) par marquage au Trichrome de Masson, à l'intérieur d'un hydrogel contenant des fibroblastes, des HUVEC et des CMLV (A) et à l'intérieur d'un hydrogel contenant des fibroblastes et des HUVEC (B).

Enfin, le marquage α -SMA nous a révélé la présence de myofibroblastes et/ou de CMLV, qu'il nous est impossible de discerner actuellement étant donné que ces deux types cellulaires expriment et répondent aux mêmes marqueurs. Des marqueurs plus spécifiques des cellules musculaires lisses vasculaires comme le marqueur de la chaîne lourde de myosine, devra être utilisée dans les recherches futures.

VII. Conclusions

Dans ce dernier chapitre porté sur la caractérisation de la biofabrication de tissus vascularisés nous avons pu étudier et comprendre l'importance des communications cellulaires établies à l'intérieur d'un hydrogel.

Tout d'abord nous avons déterminé le rôle majeur de la localisation spatiale des fibroblastes et des HUVEC dans un hydrogel bioimprimé. En effet, lorsqu'elles sont seules dans l'hydrogel, les HUVEC ne parviennent pas à développer un réseau vasculaire et restent sous forme arrondies. Au contraire, quand elles sont en co-culture avec les fibroblastes, des réseaux vasculaires se

développent à l'intérieur des hydrogels. Les fibroblastes sécrètent des facteurs angiogéniques solubles favorisant l'auto-assemblage des cellules endothéliales. Effectivement, lorsque les fibroblastes ne sont pas à proximité des cellules endothéliales, les fibroblastes ne sécrètent plus ces facteurs. Ces résultats démontrent l'effet synergique des deux types cellulaires avec un rôle essentiel des HUVEC, signalant aux fibroblastes leur besoin de facteurs permettant un développement vasculaire.

Des caractérisations histologiques ont mis en évidence la formation d'une microvascularisation grâce à un marqueur spécifique des cellules endothéliales, l'EN4. Nous avons également identifié la présence de myofibroblastes à l'intérieur des tissus par un marquage de l' α -SMA, signifiant une différenciation des fibroblastes en fibroblastes actifs, permettant la néosynthèse de matrice extracellulaire. Grâce à la technologie de microscopie électronique à transmission nous avons pu clairement mettre en évidence cette matrice extracellulaire organisée avec notamment la présence de collagène et d'élastine, composants essentiels de cette matrice. Un marquage immunohistologique nous a enfin permis de révéler la présence de collagène humain de type I dans l'ensemble du tissu, signe d'une maturation et d'un remodelage tissulaire.

Une étude par chimiluminescence nous a permis de révéler la présence de 11 protéines impliquées dans le processus d'angiogenèse dans le surnageant de culture de nos tissus bioimprimés. Ces différentes protéines, à l'origine du processus de remodelage tissulaire et de l'angiogenèse nous ont permis de confirmer les communications actives développés au sein de notre hydrogel bioimprimé entre les HUVEC et les fibroblastes.

Enfin, pour complexifier le tissu vasculaire déjà obtenu et car ces cellules sont essentielles au développement et au maintien des vaisseaux sanguins, nous avons ajouté des cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV) à notre bioencres. Cette étude primitive nous a permis d'émettre l'hypothèse de développement de structures microvasculaires plus denses que dans les hydrogels composés uniquement de fibroblastes et d'HUVEC. En effet, les CMLV seraient capables d'être recrutées par les cellules endothéliales pour jouer un rôle de péricytes, c'est-à-dire de maintien du nouveaux vaisseaux sanguins.

Des caractérisations plus poussées des tissus composés des trois types cellulaires sont à effectuer, notamment des analyses par microscopie électronique à transmission pour

déterminer la présence d'une matrice extracellulaire ainsi qu'en immunofluorescence avec de nouveaux marqueurs plus spécifiques, nous permettant de distinguer clairement les fibroblastes des CMLV. Par exemple le marqueur de la chaîne lourde de myosine des muscles lisses (SM-MHC) pour les cellules musculaires lisses devra être étudié. Enfin, des caractérisations des facteurs sécrétés par les différentes cellules en fonction des milieux nutritifs utilisés sont à prévoir.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES ET PERSPECTIVES

La vascularisation, essentielle à tous les tissus vivants du corps humain (excepté le cartilage et la cornée), est le facteur clé de la réussite du transfert de tissus bioimprimés *in vitro*, vers la médecine régénérative, pour la transplantation notamment. En effet, le développement de tissus et d'organes d'échelle physiologique centimétrique ($> 1 \text{ cm}^3$), nécessite la création d'un réseau vasculaire pour permettre la viabilité et la fonctionnalité du tissu/organe. Cette vascularisation permet d'apporter tous les nutriments et gaz et assure l'élimination des déchets produits par les cellules.

Cette thèse a eu pour but de répondre à cet enjeu primordial d'ingénierie tissulaire en développant des techniques complexes pour créer un tissu vasculaire (macrovascularisation, correspondant aux diamètres $> 6 \text{ mm}$) et un tissu vascularisé (microvascularisation, correspondant aux diamètres $< 6 \text{ mm}$) grâce au développement et à l'optimisation d'une bioencre et d'une solution de consolidation, de techniques de biofabrications de choix, ainsi que par l'étude détaillée de l'impact des communications entre les cellules vasculaires responsables de la néovascularisation et de la synthèse matricielle, essentielles à la survie d'un tissu.

En partant d'études de formulations de bioencres composées de collagène de méduse puis de collagène humains de type I, nous avons finalement développé et optimisé une bioencre proliférative composée de trois polymères naturels : la gélatine, l'alginate et le fibrinogène, répondant parfaitement aux exigences de la bioimpression 3D. L'utilisation de milieu de culture à toutes les étapes de formulation ainsi que l'optimisation d'une solution de consolidation, nous a permis de développer un tissu vascularisé fonctionnel en un temps court de 7 jours, encore jamais vu jusqu'à présent. En effet, grâce à l'utilisation de cette bioencre couplée à une co-culture de cellules vasculaires et l'ajout d'une solution de consolidation post-bioimpression assurant le maintien de l'hydrogel et améliorant la prolifération cellulaire, un tissu conjonctif a pu être créé *in vitro*.

D'un point de vue technique, nous avons étudié et développé pas moins de neuf méthodes de biofabrications différentes. Nous avons étudié dans un premier temps la méthode de bioimpression tubulaire focalisée sur le développement de macrovascularisation en créant directement une structure 3D tubulaire multicouche mimant ainsi l'architecture de la paroi vasculaire. Ces techniques doivent répondre à plusieurs paramètres définis dans un cahier des charges précis : la création (i) d'une structure tubulaire, (ii) d'une structure multicouche, (iii)

la possibilité de créer des structures complexes avec des ramifications, (iv) des structures de tailles centimétrique et (v) avoir un maintien de la structure à 21°C durant la bioimpression.

L'approche de biofabrication plane quant à elle, se focalise principalement sur l'étude des communications cellulaires à l'intérieur de l'hydrogel bioimprimé. L'avantage de cette approche est qu'elle s'affranchit du paramètre de construction d'une structure tubulaire (qui reste un procédé technique complexe) pour se focaliser sur la reproduction idéale de l'architecture de la paroi vasculaire. En effet, cette méthode permet de développer des tissus composés des trois couches vasculaires cellularisées (endothéliale, cellules musculaires lisses vasculaires et fibroblastes). Pour cela, les paramètres du cahier des charges évoluent pour ne laisser place qu'à deux critères principaux : (i) le développement d'une structure multicouche et (ii) le développement d'un modèle biologique pertinent avec notamment une épaisseur de la couche endothéliale inférieure à 100 µm.

Enfin, la dernière partie des résultats est centrée sur la biofabrication de tissus vascularisés. Pour cela, nous avons étudié le fonctionnement des cellules vasculaires à l'intérieur d'un hydrogel bioimprimé en 3D en fonction de diverses conditions de culture et d'architectures tissulaires. Dans un premier temps nous avons analysé la communication synergique entre les fibroblastes et les cellules endothéliales, jouant un rôle clé dans le développement de la microvascularisation. En effet nous avons pu mettre en évidence que les fibroblastes, en se différenciant en myofibroblastes, sont capables de néosynthétiser de la matrice extracellulaire et sécrètent également des facteurs solubles responsables de l'organisation vasculaire. Ce tissu bioimprimé a été caractérisé par de nombreuses colorations histologiques ainsi que par des marqueurs d'immunofluorescence spécifiques des microvaisseaux et des fibroblastes activés (myofibroblastes). L'ultrastructure du tissu développé a été étudié par microscopie électronique à transmission, ce qui nous a permis de mettre en évidence la néosynthèse d'une matrice extracellulaire riche en collagène de type I, en élastine mais également la présence de communication des cellules endothéliales entre elles *via* des jonctions serrées ainsi que la présence de péricytes comme support microvasculaire.

Enfin, une étude préliminaire de la complexification du tissu néovascularisé avec l'ajout d'un troisième type cellulaire, les cellules musculaires lisses vasculaires, jouant un rôle majeur dans le support et le maintien de la microvascularisation sur le long terme, a été initiée.

Les apports majeurs de ces travaux de thèse sont le développement d'un tissu conjonctif humain fonctionnel en 7 jours, grâce à la création d'une microvascularisation organisée à l'intérieur d'une matrice extracellulaire riche, permettant de répondre à une des plus grandes problématiques de la bioimpression 3D pour les besoins d'ingénierie tissulaire et de médecine générative. Une des avancées la plus remarquable est le développement d'un procédé de biofabrication utilisant du milieu de culture à toutes les étapes ainsi qu'une solution de consolidation optimale de la bioencre, permettant de maintenir une viabilité cellulaire maximale, d'augmenter la prolifération cellulaire et ainsi réduire le temps de biofabrication d'un tissu *in vitro* de 2 voir de 3 fois, par rapport aux méthodes classiques actuelles⁴³⁴.

De manière générale, ces travaux de thèse ouvrent de nombreuses perspectives pour répondre à une demande de modèles tissulaires biologiquement pertinents de la part des scientifiques pour la recherche fondamentale et de la part des entreprises, leur permettant ainsi de passer d'études *in vivo* à des études *in vitro* pertinentes, tout en gagnant un temps record. De plus, ce procédé permettrait de gagner en reproductibilité et complexification des modèles d'études. Grâce à cette approche de biofabrication, il serait possible de développer des tissus autologues humains pertinents, possédant leurs propres cellules et donc leurs propres vascularisations, permettant ainsi de réaliser des études spécifiquement adaptées sur des modèles d'échelle centimétrique (modèles réduit à moins d'1 cm² à l'heure actuelle).

Avec une compréhension approfondie des communications cellulaires et des interactions biologiques/biochimiques à l'intérieur de ce tissu bioimprimé, ces travaux de recherches permettraient un impact fort sur la médecine régénérative dans les années futures.

Au sein du laboratoire, ces résultats permettent actuellement de déverrouiller des freins de développement pour pratiquement toutes les autres études tissulaires, que ce soit pour la reproduction *in vitro* d'un micro-environnement tumoral, l'étude de la mécano-biologie de la peau ou encore pour le développement *in vitro* d'un modèle de tissu osseu. En effet, la majorité des études ont besoin d'une vascularisation à l'intérieur du tissu biofabriqué en 3D ainsi que d'un environnement mimétique. La création de ce modèle de tissu conjonctif, présent dans 80 % du corps humain et créant la base des tissus et organes, est donc une avancée majeure.

Les perspectives de recherche de ces travaux devront se concentrer sur la compréhension détaillée des communications établies à l'intérieur de ce système complexe *via* l'utilisation de méthodes de caractérisation innovants, en temps réel, permettant un suivi de maturation cellulaire durant tout le développement du tissu. Effectivement, les techniques actuelles de caractérisations de structures vivantes en 3D dans leur intégralité sont encore très limitées et dans la majorité des cas destructives pour le tissu biofabriqué (coupes histologiques, MET...).

Le développement de systèmes de culture prenant en compte les besoins de chacun des trois types cellulaire devra être étudié afin de développer des conditions de co-culture optimales pour chacune des cellules du tissu. En particulier, un milieu de culture unique pour l'auto-organisation et la prolifération de ces cellules serait à développer.

Enfin, des essais de maturation tissulaire dans des systèmes dynamiques tels que les bioréacteurs biomimétiques ont été initiés au sein du laboratoire (Figure 152) et doivent être poursuivis. L'utilisation de bioréacteurs jouerait un rôle principal lors de la biofabrication de macrovascularisations grâce à la création d'un flux luminal interne aux structures tubulaires multicouches, permettant ainsi d'améliorer leurs propriétés mécaniques, facteur le plus limitant à ce jour en ingénierie tissulaire de gros vaisseaux. Les bioréacteurs biomimétiques peuvent aussi être utilisés pour améliorer le développement et l'auto-assemblage de structures complexes en fournissant constamment un environnement mimant celui auquel les cellules sont exposées *in vivo*.

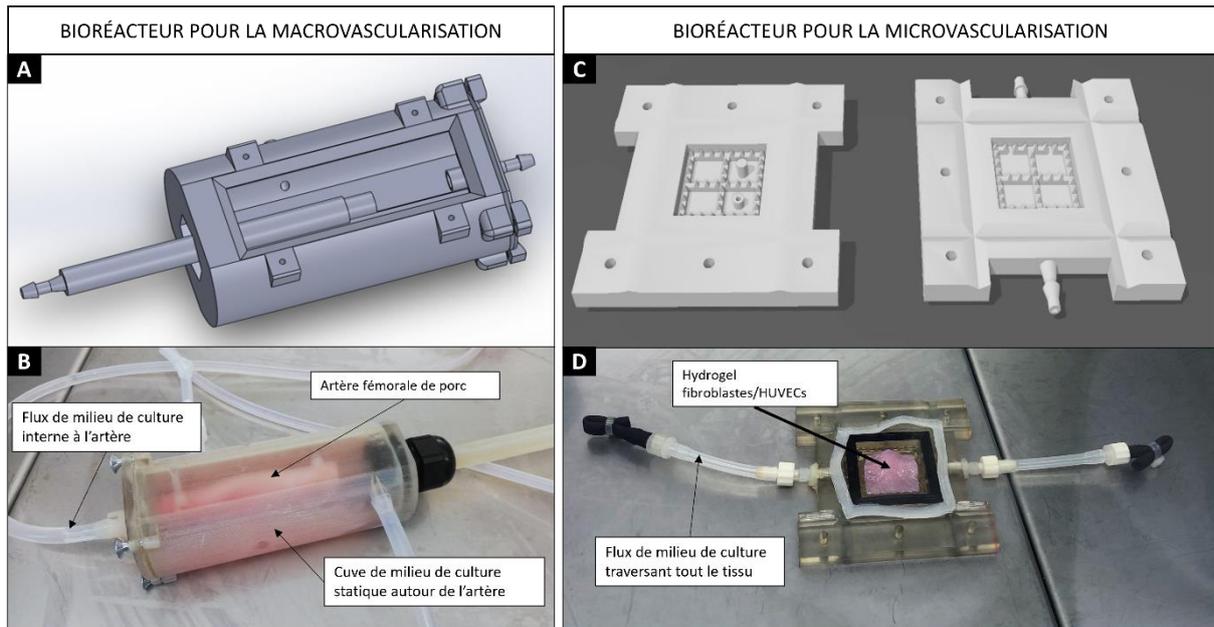


Figure 152 Les différents bioréacteurs biomimétiques, des systèmes de culture dynamique, conçus et développés au sein du laboratoire, et produits par impression 3D. **(A)** Modèle CAO d'un système de bioréacteur permettant la culture de vaisseaux sanguins de diamètre supérieur à 6 mm avec la mise en place d'un flux de milieu de culture à l'intérieur du vaisseau. **(B)** Essai expérimental de la mise en culture dynamique d'une artère fémorale prélevée chez le porc. **(C)** Modèle CAO d'un système de bioréacteur permettant la culture de tissu bioimprimé, plan avec un système de micro-dents permettant le maintien du tissu pendant toute la phase de remodelage et de maturation. **(D)** Etude expérimentale de la mise en culture dynamique d'un tissu bioimprimé contenant des fibroblastes et des HUVEC, avec l'application d'un flux de milieu de culture (DMEM/EGM2 1 :1).

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Seifu, D. G., Purnama, A., Mequanint, K. & Mantovani, D. Small-diameter vascular tissue engineering. *Nature Reviews Cardiology* vol. 10 410–421 (2013).
2. Nugent, H. M. & Edelman, E. R. Tissue Engineering Therapy for Cardiovascular Disease. *Circ. Res.* **92**, 1068–1078 (2003).
3. McGrath, J. C. *et al.* New aspects of vascular remodelling: The involvement of all vascular cell types. *Exp. Physiol.* **90**, 469–475 (2005).
4. Epstein, F. H., Gibbons, G. H. & Dzau, V. J. The emerging concept of vascular remodeling. *New England Journal of Medicine* vol. 330 1431–1438 (1994).
5. Touyz, R. Intracellular mechanisms involved in vascular remodelling of resistance arteries in hypertension: Role of angiotensin II. *Exp. Physiol.* **90**, 449–455 (2005).
6. Weinberg, C. & Bell, E. A blood vessel model constructed from collagen and cultured vascular cells. *Science (80-.)*. **231**, 397–400 (1986).
7. Weinberg, C. B. & Bell, E. Regulation of proliferation of bovine aortic endothelial cells, smooth muscle cells, and adventitial fibroblasts in collagen lattices. *J. Cell. Physiol.* **122**, 410–414 (1985).
8. Dzobo, K. *et al.* Advances in regenerative medicine and tissue engineering: Innovation and transformation of medicine. *Stem Cells Int.* **2018**, (2018).
9. Oryan, A. & Sahvieh, S. Effectiveness of chitosan scaffold in skin, bone and cartilage healing. *Int. J. Biol. Macromol.* **104**, 1003–1011 (2017).
10. Auger, F., Gibot, L. & Lacroix, D. The Pivotal Role of Vascularization in Tissue Engineering. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **15**, 177–200 (2013).
11. Baiguera, S. & Ribatti, D. Endothelialization approaches for viable engineered tissues. *Angiogenes.* 2012 161 **16**, 1–14 (2012).
12. Datta, P., Ayan, B. & Ozbolat, I. T. Bioprinting for vascular and vascularized tissue biofabrication. *Acta Biomater.* **51**, 1–20 (2017).
13. Démarchez, M. Régénération et cicatrisation de la peau. <https://biologiedelapeau.fr> (2015).

14. Witte, M. B. & Barbul, A. GENERAL PRINCIPLES OF WOUND HEALING. *Surg. Clin. North Am.* **77**, 509–528 (1997).
15. Barrientos, S., Stojadinovic, O., Golinko, M. S., Brem, H. & Tomic-Canic, M. PERSPECTIVE ARTICLE: Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair Regen.* **16**, 585–601 (2008).
16. Barrientos, S., Stojadinovic, O., Golinko, M., Brem, H. & Tomic-Canic, M. PERSPECTIVE ARTICLE: Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair Regen.* **16**, 585–601 (2008).
17. Aghaloo, T. & Hadaya, D. Basic Principles of Bioengineering and Regeneration. *Oral Maxillofac. Surg. Clin. North Am.* **29**, 1–7 (2017).
18. Auerbach, R. & Auerbach, W. Vasculogenesis and Angiogenesis. in *The New Angiotherapy* 1–6 (Humana Press, Totowa, NJ, 2002). doi:10.1007/978-1-59259-126-8_1.
19. Poole, T. J. & Coffin, J. D. Vasculogenesis and angiogenesis: Two distinct morphogenetic mechanisms establish embryonic vascular pattern. *J. Exp. Zool.* **251**, 224–231 (1989).
20. Krock, B. L., Skuli, N. & Simon, M. C. Hypoxia-Induced Angiogenesis: Good and Evil. *genes and cancer* **2**, 1117–1133 (2011).
21. Patan, S. Vasculogenesis and Angiogenesis. *Cancer Treat. Res.* **117**, 3–32 (2004).
22. Risau, W. & Flamme, I. Vasculogenesis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **11**, 73–91 (1995).
23. Tomasina, C., Bodet, T., Mota, C., Moroni, L. & Camarero-Espinosa, S. Bioprinting Vasculature: Materials, Cells and Emergent Techniques. *Mater.* 2019, Vol. 12, Page 2701 **12**, 2701 (2019).
24. Thomas, K. A. Angiogenesis. *Encycl. Cell Biol.* **4**, 102–116 (2016).
25. Risau, W. Mechanisms of angiogenesis. *Nat.* 1997 3866626 **386**, 671–674 (1997).
26. Carmeliet, P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat. Med.* 2000 64 **6**, 389–395 (2000).
27. Armulik, A., Genové, G. & Betsholtz, C. Pericytes: Developmental, Physiological, and

- Pathological Perspectives, Problems, and Promises. *Developmental Cell* vol. 21 193–215 (2011).
28. Hughes, C. Endothelial-stromal interactions in angiogenesis. *Curr. Opin. Hematol.* **15**, 204–209 (2008).
 29. Heldin, C. H., Hellberg, C. & Östman, A. PDGF and vessel maturation. *Recent Results Cancer Res.* **180**, 103–114 (2010).
 30. Armulik, A., Abramsson, A. & Betsholtz, C. Endothelial/pericyte interactions. *Circulation Research* vol. 97 512–523 (2005).
 31. Carmeliet, P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat. Med.* **2000** *64* **6**, 389–395 (2000).
 32. Darby, I. A. & Hewitson, T. D. Fibroblast Differentiation in Wound Healing and Fibrosis. *International Review of Cytology* vol. 257 143–179 (2007).
 33. Ehrlich, H. P. & Hunt, T. K. Collagen Organization Critical Role in Wound Contraction. *Adv. Wound Care* **1**, 3 (2012).
 34. Visse, R. & Nagase, H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ. Res.* **92**, 827–839 (2003).
 35. Darby, I. A., Laverdet, B., Bonté, F. & Desmoulière, A. Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing. *Clin. Cosmet. Investig. Dermatol.* **7**, 301–311 (2014).
 36. Yow, K.-H., Ingram, J., Korossis, S. A., Ingham, E. & Homer-Vanniasinkam, S. Tissue engineering of vascular conduits. *Br. J. Surg.* **93**, 652–661 (2006).
 37. Catto, V., Farè, S., Freddi, G. & Tanzi, M. C. Vascular Tissue Engineering: Recent Advances in Small Diameter Blood Vessel Regeneration. *ISRN Vasc. Med.* **2014**, 1–27 (2014).
 38. Gao, G. *et al.* Tissue Engineered Bio-Blood-Vessels Constructed Using a Tissue-Specific Bioink and 3D Coaxial Cell Printing Technique: A Novel Therapy for Ischemic Disease. *Adv. Funct. Mater.* **27**, 1700798 (2017).

39. Pober, J. S. & Tellides, G. Participation of blood vessel cells in human adaptive immune responses. *Trends Immunol.* **33**, 49–57 (2012).
40. Classification & Structure of Blood Vessels | SEER Training. <https://training.seer.cancer.gov/anatomy/cardiovascular/blood/classification.html>.
41. Fleischer, S., Tavakol, D. N. & Vunjak-Novakovic, G. From Arteries to Capillaries: Approaches to Engineering Human Vasculature. *Adv. Funct. Mater.* **30**, 1910811 (2020).
42. Lovett, M., Lee, K., Edwards, A. & Kaplan, D. L. Vascularization Strategies for Tissue Engineering. <https://home.liebertpub.com/teb> **15**, 353–370 (2009).
43. Novosel, E. C., Kleinhans, C. & Kluger, P. J. Vascularization is the key challenge in tissue engineering. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **63**, 300–311 (2011).
44. Bit, A., Suri, J. S. & Ranjani, A. Anatomy and physiology of blood vessels. in *Flow Dynamics and Tissue Engineering of Blood Vessels* 1–16 (IOP Publishing, 2020). doi:10.1088/978-0-7503-2088-7ch1.
45. Schöneberg, J. *et al.* Engineering biofunctional in vitro vessel models using a multilayer bioprinting technique. *Sci. Rep.* **8**, (2018).
46. Tucker, W. D. & Mahajan, K. Anatomy, Blood Vessels. *StatPearls* **63**, 115–126 (2018).
47. Carabasi, R. A. & Svirgals, P. The vascular system. *Clin. Atlas Off. Proced.* **4**, 259–277 (2001).
48. Cines, D. B. *et al.* Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood* vol. 91 3527–3561 (1998).
49. Fauvel-Lafève, F. Microfibrils from the arterial subendothelium. *Int. Rev. Cytol.* **188**, 1–40 (1999).
50. Stegemann, J. P., Kaszuba, S. N. & Rowe, S. L. Review: Advances in vascular tissue engineering using protein-based biomaterials. *Tissue Engineering* vol. 13 2601–2613 (2007).
51. Berillis, P. The Role of Collagen in the Aorta's Structure. *Open Circ. Vasc. J.* **6**, 1–6 (2013).
52. Campbell, G. & Campbell, J. Smooth muscle phenotypic changes in arterial wall

- homeostasis: Implications for the pathogenesis of atherosclerosis. *Exp. Mol. Pathol.* **42**, 139–162 (1985).
53. Campbell GR, Campbell J H, Manderson J A, Horrigan S & Rennick R E. Arterial smooth muscle. A multifunctional mesenchymal cell. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **112**, 977–986 (1988).
54. Tennant, M. & McGeachie, J. K. BLOOD VESSEL STRUCTURE AND FUNCTION: A BRIEF UPDATE ON RECENT ADVANCES. *Aust. N. Z. J. Surg.* **60**, 747–753 (1990).
55. Claude, E. & Didier, R. VAISSEAUX SANGUINS ET LYMPHATIQUES, Les capillaires. *Encyclopædia Universalis*.
56. Chappey, O., Wautier, M. P. & Wautier, J. L. STRUCTURE ET FONCTIONS DE L'ENDOTHELIUM. *Revue du Praticien* vol. 47 2223–2226 (1997).
57. Aird, W. C. Endothelial cell heterogeneity. in *Critical Care Medicine* vol. 31 (Lippincott Williams and Wilkins, 2003).
58. Alberts, B. *et al.* Blood Vessels and Endothelial Cells. (2002).
59. Krüger-Genge, A., Blocki, A., Franke, R. P. & Jung, F. Vascular endothelial cell biology: An update. *International Journal of Molecular Sciences* vol. 20 (2019).
60. Michiels, C. Endothelial cell functions. *Journal of Cellular Physiology* vol. 196 430–443 (2003).
61. Claesson-Welsh, L., Dejana, E. & McDonald, D. M. Permeability of the Endothelial Barrier: Identifying and Reconciling Controversies. *Trends Mol. Med.* **27**, 314–331 (2021).
62. Huber, P. Les jonctions intercellulaires endothéliales dans la formation des vaisseaux. *J. Soc. Biol.* **203**, 119–123 (2008).
63. Vestweber, D. VE-cadherin: The major endothelial adhesion molecule controlling cellular junctions and blood vessel formation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* vol. 28 223–232 (2008).
64. Starke, R. D. *et al.* Endothelial von Willebrand factor regulates angiogenesis. *Blood* **117**,

- 1071–1080 (2011).
65. Mulvany, M. J. Vascular Smooth Muscle: Structure and Function. in *Central and Peripheral Mechanisms of Cardiovascular Regulation* 83–110 (Springer US, 1986). doi:10.1007/978-1-4615-9471-0_4.
 66. Dominique X. Muscle lisse - histologie - Mikroskopia. 1–2 <https://forum.mikroskopia.com/topic/14163-muscle-lisse-histologie/> (2014).
 67. Ahmed, S. & Warren, D. T. Vascular smooth muscle cell contractile function and mechanotransduction. *Vessel Plus* **2**, 36 (2018).
 68. Humphrey, J. D., Dufresne, E. R. & Schwartz, M. A. Mechanotransduction and extracellular matrix homeostasis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* vol. 15 802–812 (2014).
 69. Wanjare, M., Kuo, F. & Gerecht, S. Derivation and maturation of synthetic and contractile vascular smooth muscle cells from human pluripotent stem cells. *Cardiovasc. Res.* **97**, 321–330 (2013).
 70. Wilson, D. Vascular smooth muscle structure and function. in *Mechanisms of Vascular Disease: A Reference Book for Vascular Specialists* 13–24 (University of Adelaide Press, 2011). doi:10.1017/UPO9781922064004.003.
 71. Fukuda, D. & Aikawa, M. Intimal smooth muscle cells: The context-dependent origin. *Circulation* vol. 122 2005–2008 (2010).
 72. Rinn, J. L., Bondre, C., Gladstone, H. B., Brown, P. O. & Chang, H. Y. Anatomic demarcation by positional variation in fibroblast gene expression programs. *PLoS Genet.* **2**, 1084–1096 (2006).
 73. Dick, M. K. & Limaiem, F. *Histology, Fibroblast. StatPearls* (StatPearls Publishing, 2019).
 74. Tripoli, M., Cordova, A. & Moschella, F. Update on the role of molecular factors and fibroblasts in the pathogenesis of Dupuytren’s disease. *J. Cell Commun. Signal.* **10**, 315–330 (2016).
 75. Desjardins-Park, H. E., Foster, D. S. & Longaker, M. T. Fibroblasts and wound healing: An update. *Regenerative Medicine* vol. 13 491–495 (2018).

76. Tracy, L. E., Minasian, R. A. & Caterson, E. J. Extracellular Matrix and Dermal Fibroblast Function in the Healing Wound. *Advances in Wound Care* vol. 5 119–136 (2016).
77. Darby, I. A., Laverdet, B., Bonté, F. & Desmoulière, A. Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology* vol. 7 301–311 (2014).
78. Newman, A. C., Nakatsu, M. N., Chou, W., Gershon, P. D. & Hughes, C. C. W. The requirement for fibroblasts in angiogenesis: Fibroblast-derived matrix proteins are essential for endothelial cell lumen formation. *Mol. Biol. Cell* **22**, 3791–3800 (2011).
79. Darby, I. A., Laverdet, B., Bonté, F. & Desmoulière, A. Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing. *Clin. Cosmet. Investig. Dermatol.* **7**, 301–311 (2014).
80. Rouget, C.-M. B. Mémoire sur le développement, la structure et les propriétés physiologique des capillaires sanguins et lymphatiques. *Arch. physiologie Norm. Pathol.* **5**, 603–663.
81. Eberth, C. J. Handbuch der Lehre von den Geweben des Menschen und der Thiere: Cap. I-XXIX -. in (1871).
82. Creazzo, T. L., Godt, R. E., Leatherbury, L., Conway, S. J. & Kirby, M. L. Role of cardiac neural crest cells in cardiovascular development. *Annual Review of Physiology* vol. 60 267–286 (1998).
83. Bergwerff, M., Verberne, M. E., DeRuiter, M. C., Poelmann, R. E. & Gittenberger-de Groot, A. C. Neural crest cell contribution to the developing circulatory system implications for vascular morphology? *Circ. Res.* **82**, 221–231 (1998).
84. Hirashi, K. & D'Amore, P. Pericytes in the microvasculature. *Cardiovasc. Res.* **32**, 667–698 (1996).
85. Griffith, L. G. & Swartz, M. A. Capturing complex 3D tissue physiology in vitro. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* vol. 7 211–224 (2006).
86. Stratman, A. N., Schwindt, A. E., Malotte, K. M. & Davis, G. E. Endothelial-derived PDGF-BB and HB-EGF coordinately regulate pericyte recruitment during vasculogenic tube assembly and stabilization. *Blood* **116**, 4720–4730 (2010).

87. Stratman, A. N., Malotte, K. M., Mahan, R. D., Davis, M. J. & Davis, G. E. Pericyte recruitment during vasculogenic tube assembly stimulates endothelial basement membrane matrix formation. *Blood* **114**, 5091–5101 (2009).
88. C, K. *et al.* Influence of Different Cell Types and Sources on Pre-Vascularisation in Fibrin and Agarose-Collagen Gels. *Organogenesis* **16**, 14–26 (2020).
89. Liu, Y., Chan, J. K. Y. & Teoh, S.-H. Review of vascularised bone tissue-engineering strategies with a focus on co-culture systems. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **9**, 85–105 (2015).
90. Morin, K. T. & Tranquillo, R. T. In vitro models of angiogenesis and vasculogenesis in fibrin gel. *Exp. Cell Res.* **319**, 2409–2417 (2013).
91. J, S. *et al.* Co-Culture of Human Endothelial Cells and Foreskin Fibroblasts on 3D Silk-Fibrin Scaffolds Supports Vascularization. *Macromol. Biosci.* **15**, 1433–1446 (2015).
92. Shi, B., Andrukhov, O., Berner, S., Schedle, A. & Rausch-Fan, X. The angiogenic behaviors of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) in co-culture with osteoblast-like cells (MG-63) on different titanium surfaces. *Dent. Mater.* **30**, 839–847 (2014).
93. Um Min Allah, N., Berahim, Z., Ahmad, A. & Kannan, T. P. Biological Interaction Between Human Gingival Fibroblasts and Vascular Endothelial Cells for Angiogenesis: A Co-culture Perspective. *Tissue Eng. Regen. Med.* **2017 145 14**, 495–505 (2017).
94. Sorrell, J. M., Baber, M. A. & Caplan, A. I. A Self-Assembled Fibroblast-Endothelial Cell Co-Culture System That Supports in vitro Vasculogenesis by both Human Umbilical Vein Endothelial Cells and Human Dermal Microvascular Endothelial Cells. *Cells Tissues Organs* **186**, 157–168 (2007).
95. D, U. *et al.* An Optimized 3D Coculture Assay for Preclinical Testing of Pro- and Antiangiogenic Drugs. *SLAS Discov. Adv. life Sci. R D* **22**, 602–613 (2017).
96. SG, G., MJ, O., MA, B., R, S. & PL, G. Neonatal human dermal fibroblasts immobilized in RGD-alginate induce angiogenesis. *Cell Transplant.* **23**, 945–957 (2014).
97. Berthod, F., Germain, L., Tremblay, N. & Auger, F. A. Extracellular matrix deposition by fibroblasts is necessary to promote capillary-like tube formation in vitro. *J. Cell. Physiol.*

- 207**, 491–498 (2006).
98. R, C.-A., R, S. & PL, G. Fibroblasts as maestros orchestrating tissue regeneration. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **12**, 240–251 (2018).
99. CJ, K., S, F. & RE, U. Co-culture systems for vascularization--learning from nature. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **63**, 291–299 (2011).
100. Zucchelli, E., Majid, Q. A. & Foldes, G. New artery of knowledge: 3D models of angiogenesis. *Vasc. Biol.* **1**, H135–H143 (2019).
101. Baldwin, J. *et al.* In vitro pre-vascularisation of tissue-engineered constructs A co-culture perspective. *Vasc. Cell* **6**, 13 (2014).
102. N, U. M. A., Z, B., A, A. & TP, K. Biological Interaction Between Human Gingival Fibroblasts and Vascular Endothelial Cells for Angiogenesis: A Co-culture Perspective. *Tissue Eng. Regen. Med.* **14**, 495–505 (2017).
103. Zhang, B. *et al.* Co-culture of mesenchymal stem cells with umbilical vein endothelial cells under hypoxic condition. *J. Huazhong Univ. Sci. Technol. [Medical Sci. 2012 322]* **32**, 173–180 (2012).
104. Berthod, F., Germain, L., Tremblay, N. & Auger, F. A. Extracellular matrix deposition by fibroblasts is necessary to promote capillary-like tube formation in vitro. *J. Cell. Physiol.* **207**, 491–498 (2006).
105. Martin, T. A., Harding, K. & Jiang, W. G. Matrix-bound fibroblasts regulate angiogenesis by modulation of VE-cadherin. *Eur. J. Clin. Invest.* **31**, 931–938 (2001).
106. Villaschi, S. & Nicosia, R. F. Paracrine interactions between fibroblasts and endothelial cells in a serum-free coculture model: Modulation of angiogenesis and collagen gel contraction. *Lab. Invest.* **71**, 291–299 (1994).
107. Orlandini, M. & Oliviero, S. In Fibroblasts Vegf-D Expression Is Induced by Cell-Cell Contact Mediated by Cadherin-11. *J. Biol. Chem.* **276**, 6576–6581 (2001).
108. Murakami, M. *et al.* The FGF system has a key role in regulating vascular integrity. *J. Clin. Invest.* **118**, 3355–3366 (2008).

109. Staton, C. A., Valluru, M., Hoh, L., Reed, M. W. R. & Brown, N. J. Angiopoietin-1, angiopoietin-2 and Tie-2 receptor expression in human dermal wound repair and scarring. *Br. J. Dermatol.* **163**, 920–927 (2010).
110. Kroll, J. & Waltenberger, J. Regulation der endothelfunktion und der angiogenese durch den vaskularen endothelialen wachstumsfaktor-A (VEGF-A). *Z. Kardiol.* **89**, 206–218 (2000).
111. Martin, T. A. Interleukin-8 and Angiogenesis. in *Growth Factors and their Receptors in Cancer Metastasis* 51–65 (Kluwer Academic Publishers, 2006). doi:10.1007/0-306-48399-8_3.
112. Cross, M. J. & Claesson-Welsh, L. FGF and VEGF function in angiogenesis: Signalling pathways, biological responses and therapeutic inhibition. *Trends in Pharmacological Sciences* vol. 22 201–207 (2001).
113. Cao, R. *et al.* Comparative Evaluation of FGF-2-, VEGF-A-, and VEGF-C-Induced Angiogenesis Lymphangiogenesis, Vascular Fenestrations, and Permeability. *Circ. Res.* **94**, 664–670 (2004).
114. Bitto, A. *et al.* Angiopoietin-1 gene transfer improves impaired wound healing in genetically diabetic mice without increasing VEGF expression. *Clin. Sci.* **114**, 707–718 (2008).
115. Fagiani, E. & Christofori, G. Angiopoietins in angiogenesis. *Cancer Letters* vol. 328 18–26 (2013).
116. El Ayadi, A., Herndon, D. N. & Finnerty, C. C. Biomarkers in Burn Patient Care. in *Total Burn Care: Fifth Edition* 232–235 (Elsevier, 2018). doi:10.1016/B978-0-323-47661-4.00021-6.
117. Murdoch, C., Monk, P. N. & Finn, A. CXC chemokine receptor expression on human endothelial cells. *Cytokine* **11**, 704–712 (1999).
118. Villaschi, S. & Nicosia, R. F. Paracrine interactions between fibroblasts and endothelial cells in a serum-free coculture model: Modulation of angiogenesis and collagen gel contraction. *Lab. Investig.* **71**, 291–299 (1994).

119. Stunova, A. & Vistejnova, L. Dermal fibroblasts—A heterogeneous population with regulatory function in wound healing. *Cytokine and Growth Factor Reviews* vol. 39 137–150 (2018).
120. Liu, H., Chen, B. & Lilly, B. Fibroblasts potentiate blood vessel formation partially through secreted factor TIMP-1. *Angiogenesis* **11**, 223–234 (2008).
121. Chambers, R. C., Leoni, P., Blanc-Brude, O. P., Wembridge, D. E. & Laurent, G. J. Thrombin is a potent inducer of connective tissue growth factor production via proteolytic activation of protease-activated receptor-1. *J. Biol. Chem.* **275**, 35584–35591 (2000).
122. R H Weiss & R Nuccitelli. Inhibition of tyrosine phosphorylation prevents thrombin-induced mitogenesis, but not intracellular free calcium release, in vascular smooth muscle cells - PubMed. *J. Biol. Chem.* **267**, 5608–5613 (1992).
123. Wang, L., Luo, J. & He, S. Induction of MMP-9 release from human dermal fibroblasts by thrombin: Involvement of JAK/STAT3 signaling pathway in MMP-9 release. *BMC Cell Biol.* **8**, 1–9 (2007).
124. Lacolley, P., Regnault, V., Segers, P. & Laurent, S. Vascular smooth muscle cells and arterial stiffening: Relevance in development, aging, and disease. *Physiol. Rev.* **97**, 1555–1617 (2017).
125. Alexander, M. R. & Owens, G. K. Epigenetic control of smooth muscle cell differentiation and phenotypic switching in vascular development and disease. *Annu. Rev. Physiol.* **74**, 13–40 (2012).
126. Jaminon, A., Reesink, K., Kroon, A. & Schurgers, L. The role of vascular smooth muscle cells in arterial remodeling: Focus on calcification-related processes. *International Journal of Molecular Sciences* vol. 20 5694 (2019).
127. Knox, M., Vinet, R., Fuentes, L., Morales, B. & Martínez, J. L. A review of endothelium-dependent and-independent vasodilation induced by phytochemicals in isolated rat aorta. *Animals* vol. 9 623 (2019).
128. Gerhardt, H. & Betsholtz, C. Endothelial-pericyte interactions in angiogenesis. *Cell and*

- Tissue Research* vol. 314 15–23 (2003).
129. Sims, D. E. Diversity within pericytes. in *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* vol. 27 842–846 (Clin Exp Pharmacol Physiol, 2000).
 130. Hirschi, K. K., Rohovsky, S. A. & D'Amore, P. A. PDGF, TGF- β , and heterotypic cell-cell interactions mediate endothelial cell-induced recruitment of 10T1/2 cells and their differentiation to a smooth muscle fate. *J. Cell Biol.* **141**, 805–814 (1998).
 131. Lindahl, P., Johansson, B. R., Levéen, P. & Betsholtz, C. Pericyte loss and microaneurysm formation in PDGF-B-deficient mice. *Science (80-.).* **277**, 242–245 (1997).
 132. Betsholtz, C., Karlsson, L. & Lindahl, P. Developmental roles of platelet-derived growth factors. *BioEssays* vol. 23 494–507 (2001).
 133. Suri, C. *et al.* Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell* **87**, 1171–1180 (1996).
 134. Sundberg, C., Kowanetz, M., Brown, L. F., Detmar, M. & Dvorak, H. F. Stable expression of angiopoietin-1 and other markers by cultured pericytes: Phenotypic similarities to a subpopulation of cells in maturing vessels during later stages of angiogenesis in vivo. *Lab. Investig.* **82**, 387–401 (2002).
 135. Uemura, A. *et al.* Recombinant angiopoietin-1 restores higher-order architecture of growing blood vessels in mice in the absence of mural cells. *J. Clin. Invest.* **110**, 1619–1628 (2002).
 136. Maisonpierre, P. C. *et al.* Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science (80-.).* **277**, 55–60 (1997).
 137. Hanahan, D. Signaling vascular morphogenesis and maintenance. *Science* vol. 277 48–50 (1997).
 138. McVerry, B. J. & Garcia, J. G. N. In vitro and in vivo modulation of vascular barrier integrity by sphingosine 1-phosphate: Mechanistic insights. *Cellular Signalling* vol. 17 131–139 (2005).
 139. Ding, R., Darland, D. C., Parmacek, M. S. & D'Amore, P. A. Endothelial-mesenchymal interactions in vitro reveal molecular mechanisms of smooth muscle/pericyte

- differentiation. *Stem Cells Dev.* **13**, 509–520 (2004).
140. Gaengel, K., Genové, G., Armulik, A. & Betsholtz, C. Endothelial-mural cell signaling in vascular development and angiogenesis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* vol. 29 630–638 (2009).
141. Gaengel, K., Genové, G., Armulik, A. & Betsholtz, C. Endothelial-mural cell signaling in vascular development and angiogenesis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* vol. 29 630–638 (2009).
142. Gungor-Ozkerim, P. S., Inci, I., Zhang, Y. S., Khademhosseini, A. & Dokmeci, M. R. Bioinks for 3D bioprinting: An overview. *Biomaterials Science* vol. 6 915–946 (2018).
143. Lee, H. J. *et al.* A New Approach for Fabricating Collagen/ECM-Based Bioinks Using Preosteoblasts and Human Adipose Stem Cells. *Adv. Healthc. Mater.* **4**, 1359–1368 (2015).
144. Mandrycky, C., Wang, Z., Kim, K. & Kim, D. H. 3D bioprinting for engineering complex tissues. *Biotechnology Advances* vol. 34 422–434 (2016).
145. Clark, D. E. & Green, H. C. *UNITED STATES 2,036,922 PATENT OFFICE 2,036,922 ALGNC ACID AND PROCESS OF MAKNG SAME.* (1935).
146. Lee, K. Y. & Mooney, D. J. Alginate: Properties and biomedical applications. *Progress in Polymer Science (Oxford)* vol. 37 106–126 (2012).
147. Goujon, I. Les alginates, excipients d'origine marine utilisés dans l'industrie pharmaceutique: applications à la synthèse d'un gel chimique. (Université Henri Poincaré - Nancy 1, 2004).
148. M A LeRoux, F Guilak & L A Setton. Compressive and shear properties of alginate gel: effects of sodium ions and alginate concentration - PubMed. *J. Biomed. Mater. Res.* **47**, 46–53 (1999).
149. Lee, K. Y. & Mooney, D. J. Alginate: Properties and biomedical applications. *Progress in Polymer Science (Oxford)* vol. 37 106–126 (2012).
150. Kuo, C. K. & Ma, P. X. Ionically crosslinked alginate hydrogels as scaffolds for tissue engineering: Part 1. Structure, gelation rate and mechanical properties. *Biomaterials*

- 22**, 511–521 (2001).
151. Grant, G. T., Morris, E. R., Rees, D. A., Smith, P. J. C. & Thom, D. Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: The egg-box model. *FEBS Lett.* **32**, 195–198 (1973).
 152. Augst, A. D., Kong, H. J. & Mooney, D. J. Alginate hydrogels as biomaterials. *Macromol. Biosci.* **6**, 623–633 (2006).
 153. Kuo, C. K. & Ma, P. X. Ionically crosslinked alginate hydrogels as scaffolds for tissue engineering: Part 1. Structure, gelation rate and mechanical properties. *Biomaterials* **22**, 511–521 (2001).
 154. Drury, J. L., Dennis, R. G. & Mooney, D. J. The tensile properties of alginate hydrogels. *Biomaterials* **25**, 3187–3199 (2004).
 155. Prasansha, R. & Balasubramanian, K. Review of Alginate-Based Hydrogel Bioprinting for Application in Tissue Engineering. *Biofabrication* **11**, (2019).
 156. Lily Y Koo ¹, Darrell J Irvine, Anne M Mayes, Douglas A Lauffenburger, L. G. G. Co-regulation of cell adhesion by nanoscale RGD organization and mechanical stimulus - PubMed. *J. Cell Sci.* **115**, 1423–1433 (2002).
 157. Ruoslahti, E. RGD and other recognition sequences for integrins. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* vol. 12 697–715 (1996).
 158. Maheshwari, G., Brown, G., Lauffenburger, D. A., Wells, A. & Griffith, L. G. Cell adhesion and motility depend on nanoscale RGD clustering. *J. Cell Sci.* **113**, 1677–1686 (2000).
 159. Lee, K. Y., Kong, H. J. & Mooney, D. J. Quantifying interactions between cell receptors and adhesion ligand-modified polymers in solution. *Macromol. Biosci.* **8**, 140–145 (2008).
 160. Su, K. & Wang, C. Recent advances in the use of gelatin in biomedical research. *Biotechnology Letters* vol. 37 2139–2145 (2015).
 161. Yue, K. *et al.* Synthesis, properties, and biomedical applications of gelatin methacryloyl (GelMA) hydrogels. *Biomaterials* vol. 73 254–271 (2015).

162. Sultana, S., Ali, M. E. & Ahamad, M. N. U. Gelatine, collagen, and single cell proteins as a natural and newly emerging food ingredients. in *Preparation and Processing of Religious and Cultural Foods* (eds. Ali, M. E., Naquiah, N. & Nizar, A.) 215–239 (Elsevier, 2018). doi:10.1016/B978-0-08-101892-7.00011-0.
163. Lv, L. C. *et al.* Fish gelatin: The novel potential applications. *Journal of Functional Foods* vol. 63 103581 (2019).
164. Abdalbbasit Adam Mariod & Hadia Fadol Adam. REVIEW: GELATIN, SOURCE, EXTRACTION AND INDUSTRIAL APPLICATIONS. *Acta Sci. Pol.* **12**, 135–147 (2013).
165. Tijore, A., Behr, J. M., Irvine, S. A., Baisane, V. & Venkatraman, S. Bioprinted gelatin hydrogel platform promotes smooth muscle cell contractile phenotype maintenance. *Biomed. Microdevices* **20**, 1–10 (2018).
166. Chen, Q. *et al.* An Interpenetrating Alginate/Gelatin Network for Three-Dimensional (3D) Cell Cultures and Organ Bioprinting. *Molecules* **25**, 756 (2020).
167. Greenberg, C. S., Birckbichler, P. J. & Rice, R. H. Transglutaminases: multifunctional cross-linking enzymes that stabilize tissues. *FASEB J.* **5**, 3071–3077 (1991).
168. Orban, J. M. *et al.* Crosslinking of collagen gels by transglutaminase. *J. Biomed. Mater. Res.* **68A**, 756–762 (2004).
169. Fortunati, D., Chau, D. Y. S., Wang, Z., Collighan, R. J. & Griffin, M. Cross-linking of collagen I by tissue transglutaminase provides a promising biomaterial for promoting bone healing. *Amino Acids* **46**, 1751–1761 (2014).
170. Yung, C. W. *et al.* Transglutaminase crosslinked gelatin as a tissue engineering scaffold. *J. Biomed. Mater. Res. - Part A* **83**, 1039–1046 (2007).
171. Nichol, J. W. *et al.* Cell-laden microengineered gelatin methacrylate hydrogels. *Biomaterials* **31**, 5536–5544 (2010).
172. Xiao, W. *et al.* Synthesis and characterization of photocrosslinkable gelatin and silk fibroin interpenetrating polymer network hydrogels. *Acta Biomater.* **7**, 2384–2393 (2011).
173. Eagle, H. STUDIES ON BLOOD COAGULATION: II. THE FORMATION OF FIBRIN FROM

- THROMBIN AND FIBRINOGEN. *J. Gen. Physiol.* **18**, 547–555 (1935).
174. Weisel, J. W. & Litvinov, R. I. Fibrin formation, structure and properties. *Subcell. Biochem.* **82**, 405–456 (2017).
175. D J Baughman, D F Waugh & C Juvkam-Wold. Properties of thrombin and fibrinogen. The comparison of clotting time averages - PubMed. *Thromb. Diath. Haemorrh.* **20**, 477–496 (1968).
176. S Narayanan. Multifunctional roles of thrombin - PubMed. *Ann. Clin. Lab. Sci.* **29**, 275–280 (1999).
177. Andrew, M. *et al.* Development of the human coagulation system in the full-term infant. *Blood* **70**, 165–172 (1987).
178. Weisel, J. W. Fibrinogen and fibrin. *Adv. Protein Chem.* **70**, 247–299 (2005).
179. MW, M., KR, S. & DA, M. The structure and biological features of fibrinogen and fibrin. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **936**, 11–30 (2001).
180. LAURENS, N., KOOLWIJK, P. & MAAT, M. P. M. DE. Fibrin structure and wound healing. *J. Thromb. Haemost.* **4**, 932–939 (2006).
181. J, M., A, F., TL, B. & CH, Y. Interaction of fibrin with VE-cadherin. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **936**, 386–405 (2001).
182. P, C. Angiogenesis in health and disease. *Nat. Med.* **9**, 653–660 (2003).
183. S, C., M, C. & B, T. Behavior of human dermal fibroblasts in three-dimensional fibrin clots: dependence on fibrinogen and thrombin concentration. *Tissue Eng.* **10**, 942–954 (2004).
184. ME, D., ES, C., HE, G., AC, B. & JF, H. Surgical considerations in the treatment of aneurysms of the thoraco-abdominal aorta. *Ann. Surg.* **162**, 650–662 (1965).
185. CC, C. Conduit options in coronary artery bypass surgery. *Chest* **108**, 1150–1155 (1995).
186. Herring, M., Gardner, A. & Glover, J. Seeding Endothelium onto Canine Arterial Prostheses: The Effects of Graft Design. *Arch. Surg.* **114**, 679–682 (1979).
187. G, K. *et al.* Mechanical properties of completely autologous human tissue engineered

- blood vessels compared to human saphenous vein and mammary artery. *Biomaterials* **30**, 1542–1550 (2009).
188. L'Heureux, N., Pâquet, S., Labbé, R., Germain, L. & Auger, F. A. A completely biological tissue-engineered human blood vessel. *FASEB J.* **12**, 47–56 (1998).
189. L, X. & HP, G. Biomaterials in the development and future of vascular grafts. *J. Vasc. Surg.* **37**, 472–480 (2003).
190. WC, J. & KK, L. A comparative evaluation of polytetrafluoroethylene, umbilical vein, and saphenous vein bypass grafts for femoral-popliteal above-knee revascularization: a prospective randomized Department of Veterans Affairs cooperative study. *J. Vasc. Surg.* **32**, 268–277 (2000).
191. M Goldman, C N McCollum, R J Hawker, Z Drolic & G Slaney. Dacron arterial grafts: the influence of porosity, velour, and maturity on thrombogenicity - PubMed. *Surgery* **92**, 947–952 (1982).
192. Wilson, S. E., Krug, R., Mueller, G. & Wilson, L. Late disruption of Dacron aortic grafts. *Ann. Vasc. Surg.* **11**, 383–386 (1997).
193. WM, A. *et al.* Prosthetic above-knee femoropopliteal bypass grafting: results of a multicenter randomized prospective trial. Above-Knee Femoropopliteal Study Group. *J. Vasc. Surg.* **25**, 19–28 (1997).
194. T Nishibe, S O'Donnell, E Pikoulis, N Rich, Y Okuda, T Kumada, F Kudo, T Tanabe, K. Y. Effects of fibronectin bonding on healing of high porosity expanded polytetrafluoroethylene grafts in pigs - PubMed. *J. Cardiovasc. Surg. (Torino)*. (2001).
195. Walluscheck, K. P., Steinhoff, G., Kelm, S. & Haverich, A. Improved endothelial cell attachment on ePTFE vascular grafts pretreated with synthetic RGD-containing peptides. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* **12**, 321–330 (1996).
196. Krijgsman, B. *et al.* An assessment of covalent grafting of RGD peptides to the surface of a compliant poly (carbonate-urea)urethane vascular conduit versus conventional biological coatings: Its role in enhancing cellular retention. *Tissue Eng.* **8**, 673–680 (2002).

197. Gray, J. L. *et al.* FGF-1 Affixation Stimulates ePTFE Endothelialization without Intimal Hyperplasia. *J. Surg. Res.* **57**, 596–612 (1994).
198. PP, H. J. *et al.* Thrombogenesis of different cell types seeded on vascular grafts and studied under blood-flow conditions. *J. Vasc. Surg.* **28**, 1094–1103 (1998).
199. SP, H. *et al.* Functional growth in tissue-engineered living, vascular grafts: follow-up at 100 weeks in a large animal model. *Circulation* **114**, (2006).
200. U, I. *et al.* Novel synthetic selectively degradable vascular prostheses: a preliminary implantation study. *J. Surg. Res.* **95**, 152–160 (2001).
201. CK, H. *et al.* Antithrombogenic property of bone marrow mesenchymal stem cells in nanofibrous vascular grafts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 11915–11920 (2007).
202. Ravi, S. & Chaikof, E. L. Biomaterials for vascular tissue engineering. *Regen. Med.* **5**, 107 (2010).
203. Niklason, L. E. *et al.* Functional arteries grown in vitro. *Science (80-.).* **284**, 489–493 (1999).
204. Miranda-Nieves, D. & Chaikof, E. L. Collagen and Elastin Biomaterials for the Fabrication of Engineered Living Tissues. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **3**, 694–711 (2016).
205. Ottani, V., Raspanti, M. & Ruggeri, A. Collagen structure and functional implications. *Micron* vol. 32 251–260 (2001).
206. L, B. *et al.* Electrospinning of collagen and elastin for tissue engineering applications. *Biomaterials* **27**, 724–734 (2006).
207. CL, C., D, G., RM, N. & JP, S. Properties of engineered vascular constructs made from collagen, fibrin, and collagen-fibrin mixtures. *Biomaterials* **25**, 3699–3706 (2004).
208. Long, J. L. & Tranquillo, R. T. Elastic fiber production in cardiovascular tissue-equivalents. *Matrix Biol.* **22**, 339–350 (2003).
209. A, P., B, F., M, S. & K, M. Elastin biosynthesis: The missing link in tissue-engineered blood vessels. *Cardiovasc. Res.* **71**, 40–49 (2006).
210. KH, S., T, M. & AL, R. Collagen as a biomaterial. *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* **3**, 231–253

- (1974).
211. ML, K., AD, D. & KM, Y. Regulation of cell adhesion and migration by cell-derived matrices. *Exp. Cell Res.* **319**, 2434–2439 (2013).
212. E, C., R, P., DR, S. & KM, Y. Taking cell-matrix adhesions to the third dimension. *Science* **294**, 1708–1712 (2001).
213. Dimitrievska, S. & Niklason, L. E. Historical perspective and future direction of blood vessel developments. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **8**, a025742 (2018).
214. AH, H. & LE, N. Engineering of arteries in vitro. *Cell. Mol. Life Sci.* **71**, 2103–2118 (2014).
215. JD, R. *et al.* Tissue-engineered vascular grafts transform into mature blood vessels via an inflammation-mediated process of vascular remodeling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 4669–4674 (2010).
216. Yamato, M. & Okano, T. Cell sheet engineering. *Mater. Today* **7**, 42–47 (2004).
217. Zurina, I. M. *et al.* Tissue engineering using a combined cell sheet technology and scaffolding approach. *Acta Biomater.* **113**, 63–83 (2020).
218. Gauvin, R. *et al.* A novel single-step self-assembly approach for the fabrication of tissue-engineered vascular constructs. *Tissue Eng. - Part A* **16**, 1737–1747 (2010).
219. Holland, I. *et al.* 3D biofabrication for tubular tissue engineering. *Bio-Design and Manufacturing* vol. 1 89–100 (2018).
220. Ratcliffe, A. Tissue engineering of vascular grafts. *Matrix Biology* vol. 19 353–357 (2000).
221. Kumar, V. A. *et al.* Acellular vascular grafts generated from collagen and elastin analogs. *Acta Biomater.* **9**, 8067–8074 (2013).
222. Othman, R. *et al.* An automated fabrication strategy to create patterned tubular architectures at cell and tissue scales. *Biofabrication* **7**, 025003 (2015).
223. Konig, G. *et al.* Mechanical properties of completely autologous human tissue engineered blood vessels compared to human saphenous vein and mammary artery. *Biomaterials* **30**, 1542–1550 (2009).

224. Sekine, H. *et al.* In vitro fabrication of functional three-dimensional tissues with perfusable blood vessels. *Nat. Commun.* 2013 41 **4**, 1–10 (2013).
225. Okano, T., Yamada, N., Okuhara, M., Sakai, H. & Sakurai, Y. Mechanism of cell detachment from temperature-modulated, hydrophilic-hydrophobic polymer surfaces. *Biomaterials* **16**, 297–303 (1995).
226. Rzaev, Z. M. O., Dinçer, S. & Pişkin, E. Functional copolymers of N-isopropylacrylamide for bioengineering applications. *Prog. Polym. Sci.* **32**, 534–595 (2007).
227. Seifu, D. G., Meghezi, S., Unsworth, L., Mequanint, K. & Mantovani, D. Viscoelastic properties of multi-layered cellularized vascular tissues fabricated from collagen gel. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* **80**, 155–163 (2018).
228. Kinoshita, K., Iwase, M., Yamada, M., Yajima, Y. & Seki, M. Fabrication of multilayered vascular tissues using microfluidic agarose hydrogel platforms. *Biotechnol. J.* **11**, 1415–1423 (2016).
229. Hasan, A., Paul, A., Memic, A. & Khademhosseini, A. A multilayered microfluidic blood vessel-like structure. *Biomed. Microdevices* **17**, 88 (2015).
230. Santos-Rosales, V., Iglesias-Mejuto, A. & García-González, C. A. Solvent-free approaches for the processing of scaffolds in regenerative medicine. *Polymers (Basel)*. **12**, 533 (2020).
231. Weinberg, C. B. & Bell, E. A blood vessel model constructed from collagen and cultured vascular cells. *Science (80-)*. **231**, 397–400 (1986).
232. Helms, F. *et al.* A 3-Layered Bioartificial Blood Vessel with Physiological Wall Architecture Generated by Mechanical Stimulation. *Ann. Biomed. Eng.* **49**, 2066–2079 (2021).
233. Loh, Q. L. & Choong, C. Three-dimensional scaffolds for tissue engineering applications: Role of porosity and pore size. *Tissue Engineering - Part B: Reviews* vol. 19 485–502 (2013).
234. Bose, S., Roy, M. & Bandyopadhyay, A. Recent advances in bone tissue engineering scaffolds. *Trends in Biotechnology* vol. 30 546–554 (2012).

235. Yang, S., Leong, K. F., Du, Z. & Chua, C. K. The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part I. Traditional factors. *Tissue Engineering* vol. 7 679–689 (2001).
236. Hollister, S. J. Porous scaffold design for tissue engineering. *Nature Materials* vol. 4 518–524 (2005).
237. Wu, S., Liu, X., Yeung, K. W. K., Liu, C. & Yang, X. Biomimetic porous scaffolds for bone tissue engineering. *Materials Science and Engineering R: Reports* vol. 80 1–36 (2014).
238. Rezwan, K., Chen, Q. Z., Blaker, J. J. & Boccaccini, A. R. Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* vol. 27 3413–3431 (2006).
239. Hutmacher, D. W. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials* **21**, 2529–2543 (2000).
240. Ovsianikov, A., Khademhosseini, A. & Mironov, V. The Synergy of Scaffold-Based and Scaffold-Free Tissue Engineering Strategies. *Trends in Biotechnology* vol. 36 348–357 (2018).
241. O’Brien, F. J. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Materials Today* vol. 14 88–95 (2011).
242. TW, G., TL, S. & SF, B. Decellularization of tissues and organs. *Biomaterials* **27**, 3675–3683 (2006).
243. SF, B. Xenogeneic extracellular matrix as a scaffold for tissue reconstruction. *Transpl. Immunol.* **12**, 367–377 (2004).
244. RW, G. *et al.* Histological evaluation of decellularised porcine aortic valves: matrix changes due to different decellularisation methods. *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* **27**, 566–571 (2005).
245. T, W. & PF, G. Effectiveness of three extraction techniques in the development of a decellularized bone-anterior cruciate ligament-bone graft. *Biomaterials* **26**, 7339–7349 (2005).
246. JS, C. & MG, D. Development of cell-seeded patellar tendon allografts for anterior cruciate ligament reconstruction. *Tissue Eng.* **10**, 1065–1075 (2004).

247. Dahl, S. L. M., Koh, J., Prabhakar, V. & Niklason, L. E. Decellularized native and engineered arterial scaffolds for transplantation. *Cell Transplant.* **12**, 659–666 (2003).
248. Ayala, P. *et al.* Evaluation of a bioengineered construct for tissue engineering applications. *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.* **106**, 2345–2354 (2018).
249. U, G. The alpha-gal epitope and the anti-Gal antibody in xenotransplantation and in cancer immunotherapy. *Immunol. Cell Biol.* **83**, 674–686 (2005).
250. Quint, C. *et al.* Decellularized tissue-engineered blood vessel as an arterial conduit. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**, 9214–9219 (2011).
251. Ramakrishna, S. *et al.* Electrospun nanofibers: Solving global issues. *Mater. Today* **9**, 40–50 (2006).
252. S, H.-H. *et al.* Three-dimensional electrospun ECM-based hybrid scaffolds for cardiovascular tissue engineering. *Biomaterials* **29**, 2907–2914 (2008).
253. Sun, B. *et al.* Advances in three-dimensional nanofibrous macrostructures via electrospinning. *Prog. Polym. Sci.* **39**, 862–890 (2014).
254. Huang, Z. M., Zhang, Y. Z., Kotaki, M. & Ramakrishna, S. A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites. *Compos. Sci. Technol.* **63**, 2223–2253 (2003).
255. Li, X. *et al.* Biomimetic dual-oriented/bilayered electrospun scaffold for vascular tissue engineering. <https://doi.org/10.1080/09205063.2019.1697171> **31**, 439–455 (2019).
256. Rim, N. G., Shin, C. S. & Shin, H. Current approaches to electrospun nanofibers for tissue engineering. *Biomed. Mater.* **8**, 014102 (2013).
257. Pham, Q. P., Sharma, U. & Mikos, A. G. Electrospinning of polymeric nanofibers for tissue engineering applications: A review. *Tissue Engineering* vol. 12 1197–1211 (2006).
258. Vunjak-Novakovic, G. *et al.* Dynamic cell seeding of polymer scaffolds for cartilage tissue engineering. *Biotechnol. Prog.* **14**, 193–202 (1998).
259. S, R., Z, Q. & EL, C. Polymeric materials for tissue engineering of arterial substitutes. *Vascular* **17 Suppl 1**, (2009).

260. Godbey, W. T., Stacey Hindy, B. S., Sherman, M. E. & Atala, A. A novel use of centrifugal force for cell seeding into porous scaffolds. *Biomaterials* **25**, 2799–2805 (2004).
261. L, S. *et al.* A seeding device for tissue engineered tubular structures. *Biomaterials* **27**, 4863–4870 (2006).
262. Perea, H., Aigner, J., Hopfner, U. & Wintermantel, E. Direct Magnetic Tubular Cell Seeding: A Novel Approach for Vascular Tissue Engineering. *Cells Tissues Organs* **183**, 156–165 (2006).
263. SH, H., IJ, T., DJ, L. & DC, C. The effect of dynamic culture conditions on endothelial cell seeding and retention on small diameter polyurethane vascular grafts. *Med. Eng. Phys.* **27**, 267–272 (2005).
264. Wu, T. *et al.* Fabrication and preliminary study of a biomimetic tri-layer tubular graft based on fibers and fiber yarns for vascular tissue engineering. *Mater. Sci. Eng. C* **82**, 121–129 (2018).
265. Thottappillil, N. & Nair, P. D. Scaffolds in vascular regeneration: Current status. *Vascular Health and Risk Management* vol. 11 79–91 (2015).
266. Nieponice, A. *et al.* In Vivo assessment of a tissue-engineered vascular graft combining a biodegradable elastomeric scaffold and muscle-derived stem cells in a rat model. *Tissue Eng. - Part A* **16**, 1215–1223 (2010).
267. Zhang, L., Zhou, J., Lu, Q., Wei, Y. & Hu, S. A novel small-diameter vascular graft: In vivo behavior of biodegradable three-layered tubular scaffolds. *Biotechnol. Bioeng.* **99**, 1007–1015 (2008).
268. Tatterton, M., Wilshaw, S. P., Ingham, E. & Homer-Vanniasinkam, S. The Use of Antithrombotic Therapies in Reducing Synthetic Small-Diameter Vascular Graft Thrombosis. *Vascular and Endovascular Surgery* vol. 46 212–222 (2012).
269. Tucker, E. I. *et al.* Prevention of vascular graft occlusion and thrombus-associated thrombin generation by inhibition of factor XI. *Blood* **113**, 936–944 (2009).
270. Abbott, W. M., Megerman, J., Hasson, J. E., L'Italien, G. & Warnock, D. F. Effect of compliance mismatch on vascular graft patency. *J. Vasc. Surg.* **5**, 376–382 (1987).

271. Finnes, T. & Letcher, T. *High Definition 3D Printing-Comparing SLA and FDM Printing Technologies. The Journal of Undergraduate Research* vol. 13 <http://openprairie.sdstate.edu/jurhttp://openprairie.sdstate.edu/jur/vol13/iss1/3HIGHDEFINITION3DPRINTING> (2015).
272. Murphy, S. V. & Atala, A. 3D bioprinting of tissues and organs. *Nature Biotechnology* vol. 32 773–785 (2014).
273. Lee, J. M., Sing, S. L., Zhou, M. & Yeong, W. Y. 3D bioprinting processes: A perspective on classification and terminology. *Int. J. Bioprinting* **4**, (2018).
274. Mironov, V. *et al.* Organ printing: Tissue spheroids as building blocks. *Biomaterials* **30**, 2164–2174 (2009).
275. Visconti, R. P. *et al.* Towards organ printing: Engineering an intra-organ branched vascular tree. *Expert Opinion on Biological Therapy* vol. 10 409–420 (2010).
276. R, D. *et al.* Cell patterning by laser-assisted bioprinting. *Methods Cell Biol.* **119**, 159–174 (2014).
277. Koch, L., Gruene, M., Unger, C. & Chichkov, B. Laser Assisted Cell Printing. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **14**, 91–97 (2013).
278. Iwanaga, S., Arai, K. & Nakamura, M. Inkjet Bioprinting. in *Essentials of 3D Biofabrication and Translation* (eds. Atala, A. & Yoo, J. J.) 61–79 (Elsevier, 2015). doi:10.1016/B978-0-12-800972-7.00004-9.
279. Ning, L. & Chen, X. A brief review of extrusion-based tissue scaffold bio-printing. *Biotechnol. J.* **12**, 1600671 (2017).
280. K, C. *et al.* Freeform inkjet printing of cellular structures with bifurcations. *Biotechnol. Bioeng.* **112**, 1047–1055 (2015).
281. A, A.-Y. *et al.* Towards artificial tissue models: past, present, and future of 3D bioprinting. *Biofabrication* **8**, (2016).
282. Murphy, S. V. & Atala, A. 3D bioprinting of tissues and organs. *Nature Biotechnology* vol. 32 773–785 (2014).

283. Starly, B. & Shirwaiker, R. 3D Bioprinting Techniques. in *3D Bioprinting and Nanotechnology in Tissue Engineering and Regenerative Medicine* 57–77 (Elsevier Inc., 2015). doi:10.1016/B978-0-12-800547-7.00003-5.
284. Kirchmayer, D. M., Gorkin, R. & In Het Panhuis, M. An overview of the suitability of hydrogel-forming polymers for extrusion-based 3D-printing. *J. Mater. Chem. B* **3**, 4105–4117 (2015).
285. Hölzl, K. *et al.* Bioink properties before, during and after 3D bioprinting. *Biofabrication* **8**, 032002 (2016).
286. Ozbolat, I. T. & Hospodiuk, M. Current advances and future perspectives in extrusion-based bioprinting. *Biomaterials* vol. 76 321–343 (2016).
287. Seol, Y. J., Kang, H. W., Lee, S. J., Atala, A. & Yoo, J. J. Bioprinting technology and its applications. *European Journal of Cardio-thoracic Surgery* vol. 46 342–348 (2014).
288. T, B., T, X., B, D. & X, C. Application of inkjet printing to tissue engineering. *Biotechnol. J.* **1**, 910–917 (2006).
289. Koçak, E., Yıldız, A. & Acartürk, F. Three dimensional bioprinting technology: Applications in pharmaceutical and biomedical area. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **197**, 111396 (2021).
290. Edgar Yong Sheng Tan, W. Y. Y. Concentric bioprinting of alginate-based tubular constructs using multi-nozzle extrusion-based technique. *Int. J. Bioprinting* **1**, 49–56 (2015).
291. Norotte, C., Marga, F. S., Niklason, L. E. & Forgacs, G. Scaffold-free vascular tissue engineering using bioprinting. *Biomaterials* **30**, 5910–5917 (2009).
292. Moldovan, N., Hibino, N. & Nakayama, K. Principles of the Kenzan Method for Robotic Cell Spheroid-Based 3 D Bioprinting. (2016).
293. Nakayama, K. Development of a Scaffold-Free 3D Biofabrication System “Kenzan Method”. in *Kenzan Method for Scaffold-Free Biofabrication* 1–15 (Springer International Publishing, 2021). doi:10.1007/978-3-030-58688-1_1.
294. Gao, G. *et al.* Tissue-engineering of vascular grafts containing endothelium and smooth-

- muscle using triple-coaxial cell printing. *Appl. Phys. Rev.* **6**, 041402 (2019).
295. Jia, W. *et al.* Direct 3D bioprinting of perfusable vascular constructs using a blend bioink. *Biomaterials* **106**, 58–68 (2016).
296. Pi, Q. *et al.* Digitally Tunable Microfluidic Bioprinting of Multilayered Cannular Tissues. *Adv. Mater.* **30**, e1706913 (2018).
297. Kjar, A., McFarland, B., Mecham, K., Harward, N. & Huang, Y. Engineering of tissue constructs using coaxial bioprinting. *Bioact. Mater.* **6**, 460–471 (2021).
298. Cooley, J. F. *APPARATUS FOR ELECTRICALLY DisPERSING FLUIDs.* (1899).
299. Schrenk, H. A. *Process and apparatus for spinning artificial silk.* (1933).
300. Sugamori, M. E. & Sefton, M. V. Microencapsulation of pancreatic islets in a water insoluble polyacrylate. *ASAIO Trans.* **35**, 791–799 (1989).
301. Sefton, M. V., Dawson, R. M., Broughton, R. L., Blyzniuk, J. & Sugamori, M. E. Microencapsulation of mammalian cells in a water-insoluble polyacrylate by coextrusion and interfacial precipitation. *Biotechnol. Bioeng.* **29**, 1135–1143 (1987).
302. Zein, I., Hutmacher, D. W., Tan, K. C. & Teoh, S. H. Fused deposition modeling of novel scaffold architectures for tissue engineering applications. *Biomaterials* **23**, 1169–1185 (2002).
303. Kim, G., Ahn, S., Kim, Y., Cho, Y. & Chun, W. Coaxial structured collagen-alginate scaffolds: Fabrication, physical properties, and biomedical application for skin tissue regeneration. *J. Mater. Chem.* **21**, 6165–6172 (2011).
304. Gao, G. *et al.* Tissue-engineering of vascular grafts containing endothelium and smooth-muscle using triple-coaxial cell printing. *Appl. Phys. Rev.* **6**, 41402 (2019).
305. Gao, Q. *et al.* 3D Bioprinting of Vessel-like Structures with Multilevel Fluidic Channels. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **3**, 399–408 (2017).
306. Shiwarski, D. J., Hudson, A. R., Tashman, J. W. & Feinberg, A. W. Emergence of FRESH 3D printing as a platform for advanced tissue biofabrication. *APL Bioengineering* vol. 5 (2021).

307. Hinton, T. J. *et al.* Three-dimensional printing of complex biological structures by freeform reversible embedding of suspended hydrogels. *Sci. Adv.* **1**, e1500758 (2015).
308. Tibbits, S. 4D printing: Multi-material shape change. *Archit. Des.* **84**, 116–121 (2014).
309. Sydney Gladman, A., Matsumoto, E. A., Nuzzo, R. G., Mahadevan, L. & Lewis, J. A. Biomimetic 4D printing. *Nat. Mater.* **15**, 413–418 (2016).
310. Tibbits, S. 4D printing: Multi-material shape change. *Archit. Des.* **84**, 116–121 (2014).
311. Devillard, C. D., Mandon, C. A., Lambert, S. A., Blum, L. J. & Marquette, C. A. Bioinspired Multi-Activities 4D Printing Objects: A New Approach Toward Complex Tissue Engineering. *Biotechnol. J.* **13**, (2018).
312. Mandon, C. A., Blum, L. J. & Marquette, C. A. Adding Biomolecular Recognition Capability to 3D Printed Objects. *Anal. Chem.* **88**, 10767–10772 (2016).
313. Ashammakhi, N. *et al.* Advances and Future Perspectives in 4D Bioprinting. *Biotechnology Journal* vol. 13 1800148 (2018).
314. Yang, G. H., Yeo, M., Koo, Y. W. & Kim, G. H. 4D Bioprinting: Technological Advances in Biofabrication. *Macromolecular Bioscience* vol. 19 1800441 (2019).
315. Kirillova, A., Maxson, R., Stoychev, G., Gomillion, C. T. & Ionov, L. 4D Biofabrication Using Shape-Morphing Hydrogels. *Adv. Mater.* **29**, 1703443 (2017).
316. Kaji, H., Takii, Y., Nishizawa, M. & Matsue, T. Pharmacological characterization of micropatterned cardiac myocytes. *Biomaterials* **24**, 4239–4244 (2003).
317. Chen, P. *et al.* Bioacoustic-enabled patterning of human iPSC-derived cardiomyocytes into 3D cardiac tissue. *Biomaterials* **131**, 47–57 (2017).
318. R, C.-A., PL, G., R, S. & SG, G. Cellular strategies to promote vascularisation in tissue engineering applications. *Eur. Cell. Mater.* **28**, 51–67 (2014).
319. Xiao, X. *et al.* The promotion of angiogenesis induced by three-dimensional porous beta-tricalcium phosphate scaffold with different interconnection sizes via activation of PI3K/Akt pathways. *Sci. Reports 2015 51* **5**, 1–11 (2015).
320. W.C., C., JainDevika, A.G., M. & Paul, S. Pro-Angiogenic Character of Endothelial Cells

- and Gingival Fibroblasts Cocultures in Perfused Degradable Polyurethane Scaffolds. <https://home-liebertpub-com.docelec.univ-lyon1.fr/tea> **21**, 1587–1599 (2015).
321. Sarker, M., Chen, X. B. & Schreyer, D. J. Experimental approaches to vascularisation within tissue engineering constructs. <http://dx.doi.org.docelec.univ-lyon1.fr/10.1080/09205063.2015.1059018> **26**, 683–734 (2015).
322. J, T. Tissue Engineering of the Microvasculature. *Compr. Physiol.* **9**, 1155–1212 (2019).
323. Xie, R., Zheng, W., Guan, L., Ai, Y. & Liang, Q. Engineering of Hydrogel Materials with Perfusable Microchannels for Building Vascularized Tissues. *Small* **16**, 1902838 (2020).
324. Yang, G., Mahadik, B., Choi, J. Y. & Fisher, J. P. Vascularization in tissue engineering: fundamentals and state-of-art. *Prog. Biomed. Eng.* **2**, 012002 (2020).
325. KIRAN, H. H. IN VITRO ESTABLISHMENT OF VASCULARISED SKIN AND ORAL MUCOSA FROM HUMAN EMBRYONIC STEM CELLS FOR PRE-CLINICAL STUDIES AND INDUSTRIAL APPLICATIONS. (NUS University, 2017).
326. Saberianpour, S. *et al.* Tissue engineering strategies for the induction of angiogenesis using biomaterials. *J. Biol. Eng.* 2018 121 **12**, 1–15 (2018).
327. J, S. *et al.* Co-Culture of Human Endothelial Cells and Foreskin Fibroblasts on 3D Silk-Fibrin Scaffolds Supports Vascularization. *Macromol. Biosci.* **15**, 1433–1446 (2015).
328. T, T., S, S. & M, Y. In vitro formation of vascular-like networks using hydrogels. *J. Biosci. Bioeng.* **122**, 519–527 (2016).
329. Ceccarelli, J. & Putnam, A. J. Sculpting the blank slate: How fibrin’s support of vascularization can inspire biomaterial design. *Acta Biomaterialia* vol. 10 1515–1523 (2014).
330. CE, V., T, G.-F., S, J., P, S. & JK, L. Tunable fibrin-alginate interpenetrating network hydrogels to support cell spreading and network formation. *Acta Biomater.* **108**, 142–152 (2020).
331. Benavides, O. M. *et al.* Capillary-like network formation by human amniotic fluid-derived stem cells within fibrin/poly(ethylene glycol) hydrogels. *Tissue Eng. - Part A* **21**, 1185–1194 (2015).

332. Chen, Y.-C. *et al.* Functional Human Vascular Network Generated in Photocrosslinkable Gelatin Methacrylate Hydrogels. *Adv. Funct. Mater.* **22**, 2027 (2012).
333. Li, S. *et al.* Hydrogels with precisely controlled integrin activation dictate vascular patterning and permeability. *Nat. Mater.* **2017 169 16**, 953–961 (2017).
334. Tomasina, C., Bodet, T., Mota, C., Moroni, L. & Camarero-Espinosa, S. Bioprinting Vasculature: Materials, Cells and Emergent Techniques. *Mater.* **2019, Vol. 12, Page 2701 12**, 2701 (2019).
335. Jain, R. K., Au, P., Tam, J., Duda, D. G. & Fukumura, D. Engineering vascularized tissue. *Nat. Biotechnol.* **2005 237 23**, 821–823 (2005).
336. Chu, H. & Wang, Y. Therapeutic angiogenesis: controlled delivery of angiogenic factors. <http://dx.doi.org/10.4155/tde.12.50> **3**, 693–714 (2012).
337. Hedman, M., Hartikainen, J. & Ylä-Herttuala, S. Progress and prospects: hurdles to cardiovascular gene therapy clinical trials. *Gene Ther.* **2011 188 18**, 743–749 (2011).
338. Losordo, D. W. & Dimmeler, S. Therapeutic Angiogenesis and Vasculogenesis for Ischemic Disease. *Circulation* **109**, 2692–2697 (2004).
339. Leeper, N. J., Hunter, A. L. & Cooke, J. P. Stem Cell Therapy for Vascular Regeneration. *Circulation* **122**, 517–526 (2010).
340. Takeshita, S. *et al.* Therapeutic angiogenesis. A single intraarterial bolus of vascular endothelial growth factor augments revascularization in a rabbit ischemic hind limb model. *J. Clin. Invest.* **93**, 662 (1994).
341. J, B. *et al.* Effect of fibroblast growth factor NV1FGF on amputation and death: a randomised placebo-controlled trial of gene therapy in critical limb ischaemia. *Lancet (London, England)* **377**, 1929–1937 (2011).
342. Lokmic, Z., Stillaert, F., Morrison, W. A., Thompson, E. W. & Mitchell, G. M. An arteriovenous loop in a protected space generates a permanent, highly vascular, tissue-engineered construct. *FASEB J.* **21**, 511–522 (2007).
343. Chang, W. G. & Niklason, L. E. A short discourse on vascular tissue engineering. *npj Regen. Med.* **2**, 1–8 (2017).

344. Petersen, T. H. *et al.* Tissue-Engineered Lungs for in Vivo Implantation. *Science* (80-). **329**, 538–541 (2010).
345. Ott, H. C. *et al.* Regeneration and orthotopic transplantation of a bioartificial lung. *Nat. Med.* 2010 168 **16**, 927–933 (2010).
346. Tong, C. *et al.* Generation of bioartificial hearts using decellularized scaffolds and mixed cells. *Biomed. Eng. OnLine* 2019 181 **18**, 1–13 (2019).
347. Song, J. J. *et al.* Regeneration and experimental orthotopic transplantation of a bioengineered kidney. *Nat. Med.* 2013 195 **19**, 646–651 (2013).
348. Uygun, B. E. *et al.* Organ reengineering through development of a transplantable recellularized liver graft using decellularized liver matrix. *Nat. Med.* 2010 167 **16**, 814–820 (2010).
349. N Ilan, S Mahooti & J A Madri. Distinct signal transduction pathways are utilized during the tube formation and survival phases of in vitro angiogenesis - PubMed. *J. Cell Sci.* **111**, 3621–3631 (1998).
350. Schechner, J. S. *et al.* In vivo formation of complex microvessels lined by human endothelial cells in an immunodeficient mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**, 9191–9196 (2000).
351. Utzinger, U., Baggett, B., Weiss, J. A., Hoying, J. B. & Edgar, L. T. Large-scale time series microscopy of neovessel growth during angiogenesis. *Angiogenes.* 2015 183 **18**, 219–232 (2015).
352. Zheng, Y. *et al.* In vitro microvessels for the study of angiogenesis and thrombosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**, 9342–9347 (2012).
353. Moya, M. L., Hsu, Y.-H., Lee, A. P., Hughes, C. C. W. & George, S. C. In Vitro Perfused Human Capillary Networks. *Tissue Eng. - Part C Methods* **19**, 730–737 (2013).
354. Kim, S., Lee, H., Chung, M. & Jeon, N. L. Engineering of functional, perfusable 3D microvascular networks on a chip. *Lab Chip* **13**, 1489–1500 (2013).
355. Hasan, A. *et al.* Microfluidic techniques for development of 3D vascularized tissue. *Biomaterials* **35**, 7308–7325 (2014).

356. Price, G. M. *et al.* Effect of mechanical factors on the function of engineered human blood microvessels in microfluidic collagen gels. *Biomaterials* **31**, 6182–6189 (2010).
357. Miller, J. S. *et al.* Rapid casting of patterned vascular networks for perfusable engineered three-dimensional tissues. *Nat. Mater.* **2012 119 11**, 768–774 (2012).
358. Attwood, D., Collett, J. H. & Tait, C. J. The micellar properties of the poly(oxyethylene) - poly(oxypropylene) copolymer Pluronic F127 in water and electrolyte solution. *Int. J. Pharm.* **26**, 25–33 (1985).
359. M, M., J, B., M, S. & M, Z.-W. Nanostructured Pluronic hydrogels as bioinks for 3D bioprinting. *Biofabrication* **7**, (2015).
360. Morgan, J. P. *et al.* Formation of microvascular networks in vitro. *Nat. Protoc.* **2013 89 8**, 1820–1836 (2013).
361. Zhang, B. *et al.* Biodegradable scaffold with built-in vasculature for organ-on-a-chip engineering and direct surgical anastomosis. *Nat. Mater.* **2016 156 15**, 669–678 (2016).
362. Zheng, Y. *et al.* In vitro microvessels for the study of angiogenesis and thrombosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**, 9342–9347 (2012).
363. Brown, T. E., Marozas, I. A. & Anseth, K. S. Amplified Photodegradation of Cell-Laden Hydrogels via an Addition–Fragmentation Chain Transfer Reaction. *Adv. Mater.* **29**, 1605001 (2017).
364. Heintz, K. A. *et al.* Fabrication of 3D Biomimetic Microfluidic Networks in Hydrogels. *Adv. Healthc. Mater.* **5**, 2153–2160 (2016).
365. Song, H. H. G., Rumma, R. T., Ozaki, C. K., Edelman, E. R. & Chen, C. S. Vascular Tissue Engineering: Progress, Challenges, and Clinical Promise. *Cell Stem Cell* **22**, 340–354 (2018).
366. Nguyen, D.-H. T. *et al.* Biomimetic model to reconstitute angiogenic sprouting morphogenesis in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**, 6712–6717 (2013).
367. Kim, S., Lee, H., Chung, M. & Jeon, N. L. Engineering of functional, perfusable 3D microvascular networks on a chip. *Lab Chip* **13**, 1489–1500 (2013).

368. Song, J. W. & Munn, L. L. Fluid forces control endothelial sprouting. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**, 15342–15347 (2011).
369. Galie, P. A. *et al.* Fluid shear stress threshold regulates angiogenic sprouting. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**, 7968–7973 (2014).
370. Pugh, C. W. & Ratcliffe, P. J. Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nat. Med.* 2003 96 **9**, 677–684 (2003).
371. Moore, M., Moore, R. & McFetridge, P. S. Directed oxygen gradients initiate a robust early remodeling response in engineered vascular grafts. *Tissue Eng. - Part A* **19**, 2005–2013 (2013).
372. Déry, M. A. C., Michaud, M. D. & Richard, D. E. Hypoxia-inducible factor 1: regulation by hypoxic and non-hypoxic activators. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **37**, 535–540 (2005).
373. Semenza, G. L. Hypoxia-Inducible Factors in Physiology and Medicine. *Cell* **148**, 399–408 (2012).
374. Nakatsu, M. N. *et al.* Angiogenic sprouting and capillary lumen formation modeled by human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) in fibrin gels: The role of fibroblasts and Angiopoietin-1. *Microvasc. Res.* **66**, 102–112 (2003).
375. Kubota, Y., Kleinman, H. K., Martin, G. R. & Lawley, T. J. Role of laminin and basement membrane in the morphological differentiation of human endothelial cells into capillary-like structures. *J. Cell Biol.* **107**, 1589–1598 (1988).
376. WhislerJordan, A., ChenMichelle, B. & KammRoger, D. Control of Perfusable Microvascular Network Morphology Using a Multiculture Microfluidic System. *Tissue Eng. - Part C Methods* **20**, 543–552 (2012).
377. Chen, X. *et al.* *Prevascularization of a Fibrin-Based Tissue Construct Accelerates the Formation of Functional Anastomosis with Host Vasculature.*
www.liebertonline.com=ten.
378. Lin, S. L., Kisseleva, T., Brenner, D. A. & Duffield, J. S. Pericytes and Perivascular Fibroblasts Are the Primary Source of Collagen-Producing Cells in Obstructive Fibrosis of the Kidney. *Am. J. Pathol.* **173**, 1617–1627 (2008).

379. Jeon, J. S. *et al.* Generation of 3D functional microvascular networks with human mesenchymal stem cells in microfluidic systems. *Integr. Biol.* **6**, 555–563 (2014).
380. Stratman, A. N. & Davis, G. E. Endothelial Cell-Pericyte Interactions Stimulate Basement Membrane Matrix Assembly: Influence on Vascular Tube Remodeling, Maturation, and Stabilization. *Microsc. Microanal.* **18**, 68–80 (2012).
381. Saunders, W. B. *et al.* Coregulation of vascular tube stabilization by endothelial cell TIMP-2 and pericyte TIMP-3. *J. Cell Biol.* **175**, 179–191 (2006).
382. Bowers, S. L. K., Meng, C.-X., Davis, M. T. & Davis, G. E. Investigating Human Vascular Tube Morphogenesis and Maturation Using Endothelial Cell-Pericyte Co-cultures and a Doxycycline-Inducible Genetic System in 3D Extracellular Matrices. *Methods Mol. Biol.* **1189**, 171–189 (2015).
383. Kusuma, S. *et al.* Self-organized vascular networks from human pluripotent stem cells in a synthetic matrix. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**, 12601–12606 (2013).
384. Klein, D. iPSCs-based generation of vascular cells: reprogramming approaches and applications. *Cellular and Molecular Life Sciences* vol. 75 1411–1433 (2018).
385. Palladino, A. *et al.* Induced Pluripotent Stem Cells as Vasculature Forming Entities. *J. Clin. Med.* **8**, (2019).
386. Park, K. M. & Gerecht, S. Hypoxia-inducible hydrogels. *Nat. Commun.* **2014 51 5**, 1–12 (2014).
387. Moya, M. L., Hsu, Y.-H., Lee, A. P., Hughes, C. C. W. & George, S. C. In Vitro Perfused Human Capillary Networks. *Tissue Eng. - Part C Methods* **19**, 730–737 (2013).
388. Belair, D. G. *et al.* Human Vascular Tissue Models Formed from Human Induced Pluripotent Stem Cell Derived Endothelial Cells. *Stem Cell Rev. Reports 2014 113* **11**, 511–525 (2014).
389. Mastrullo, V., Cathery, M., Velliou, E., Madeddu, P. & Campagnolo, P. Angiogenesis in Tissue Engineering: As Nature Intended? *Front. Bioeng. Biotechnol.* **8**, 1–9 (2020).
390. Boccardo, S. *et al.* Engineered mesenchymal cell-based patches as controlled VEGF delivery systems to induce extrinsic angiogenesis. *Acta Biomater.* **42**, 127–135 (2016).

391. Omid, M., Almeida, L. & Tayebi, L. Microfluidic-assisted fabrication of reverse micelle/PLGA hybrid microspheres for sustained vascular endothelial growth factor delivery. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **68**, 616–625 (2021).
392. Sacchi, V. *et al.* Long-lasting fibrin matrices ensure stable and functional angiogenesis by highly tunable, sustained delivery of recombinant VEGF164. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 6952–6957 (2014).
393. Sarker, M., Chen, X. & Schreyer, D. J. Experimental approaches to vascularisation within tissue engineering constructs. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **26**, 683–734 (2015).
394. Barthes, J. *et al.* Cell Microenvironment Engineering and Monitoring for Tissue Engineering and Regenerative Medicine: The Recent Advances. *BioMed Research International* vol. 2014 (2014).
395. Bonnier, F. *et al.* Cell viability assessment using the Alamar blue assay: A comparison of 2D and 3D cell culture models. *Toxicol. Vitro.* **29**, 124–131 (2015).
396. Khoruzhenko, A. I. 2D- and 3D-cell culture. *Biopolym. Cell* **27**, 17–24 (2011).
397. Fontoura, J. C. *et al.* Comparison of 2D and 3D cell culture models for cell growth, gene expression and drug resistance. *Mater. Sci. Eng. C* **107**, 110264 (2020).
398. Ravi, M., Paramesh, V., Kaviya, S. R., Anuradha, E. & Paul Solomon, F. D. 3D cell culture systems: Advantages and applications. *J. Cell. Physiol.* **230**, 16–26 (2015).
399. Kellner, K. *et al.* Determination of oxygen gradients in engineered tissue using a fluorescent sensor. *Biotechnol. Bioeng.* **80**, 73–83 (2002).
400. Radisic, M. *et al.* Oxygen gradients correlate with cell density and cell viability in engineered cardiac tissue. *Biotechnol. Bioeng.* **93**, 332–343 (2006).
401. Cheema, U., Brown, R. A., Alp, B. & MacRobert, A. J. Spatially defined oxygen gradients and vascular endothelial growth factor expression in an engineered 3D cell model. *Cell. Mol. Life Sci.* **65**, 177–186 (2008).
402. Ahn, G. *et al.* Effect of pore architecture on oxygen diffusion in 3d scaffolds for tissue engineering. *J. Biomech. Eng.* **132**, 1–5 (2010).

403. Griffith, C. K. *et al.* Diffusion limits of an in vitro thick prevascularized tissue. *Tissue Eng.* **11**, 257–266 (2005).
404. Cheema, U. *et al.* Oxygen diffusion through collagen scaffolds at defined densities: Implications for cell survival in tissue models. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **6**, 77–84 (2012).
405. Harpool, T. D. *OBSERVING THE EFFECTS OF INFILL SHAPES ON THE TENSILE CHARACTERISTICS OF 3D PRINTED PLASTIC PARTS A Thesis by.* <https://soar.wichita.edu/handle/10057/13504> (2016).
406. Homan, K. A. *et al.* Flow-enhanced vascularization and maturation of kidney organoids in vitro. *Nat. Methods* **16**, 255–262 (2019).
407. Ruan, J.-L. *et al.* Mechanical Stress Promotes Maturation of Human Myocardium From Pluripotent Stem Cell-Derived Progenitors. *Stem Cells* **33**, 2148–2157 (2015).
408. Kobayashi, N. *et al.* Mechanical stress promotes the expression of smooth muscle-like properties in marrow stromal cells. *Exp. Hematol.* **32**, 1238–1245 (2004).
409. Ruan, J. L. *et al.* Mechanical Stress Conditioning and Electrical Stimulation Promote Contractility and Force Maturation of Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Human Cardiac Tissue. *Circulation* **134**, 1557–1567 (2016).
410. Çelebi-Saltik, B., Öteyaka, M. Ö. & Gökçinar-Yagci, B. Stem cell-based small-diameter vascular grafts in dynamic culture. *Connect. Tissue Res.* **62**, 151–163 (2021).
411. Kural, M. H., Dai, G., Niklason, L. E. & Gui, L. An Ex Vivo Vessel Injury Model to Study Remodeling. *Cell Transplant.* **27**, 1375–1389 (2018).
412. Wang, J. *et al.* Ex vivo blood vessel bioreactor for analysis of the biodegradation of magnesium stent models with and without vessel wall integration. *Acta Biomater.* **50**, 546–555 (2017).
413. Bono, N. *et al.* A Dual-Mode Bioreactor System for Tissue Engineered Vascular Models. *Ann. Biomed. Eng.* **45**, 1496–1510 (2017).
414. Pennings, I. *et al.* Layer-specific cell differentiation in bi-layered vascular grafts under flow perfusion. *Biofabrication* **12**, 15009 (2019).

415. Pennings, I. *et al.* Layer-specific Cell Differentiation in Bi-Layered Vascular Grafts Under Flow Perfusion - PubMed. *Biofabrication* **12**, 15009 (2019).
416. Lin, S. & Mequanint, K. Bioreactor-induced mesenchymal progenitor cell differentiation and elastic fiber assembly in engineered vascular tissues. *Acta Biomater.* **59**, 200–209 (2017).
417. Park, I. S., Kim, Y. H., Jung, Y., Kim, S. H. & Kim, S. H. A dynamically cultured collagen/cells-incorporated elastic scaffold for small-diameter vascular grafts. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **23**, 1807–1820 (2012).
418. Çelebi-Saltik, B., Öteyaka, M. Ö. & Gökçinar-Yagci, B. Stem cell-based small-diameter vascular grafts in dynamic culture. *Connect. Tissue Res.* **62**, 151–163 (2021).
419. Hansmann, J., Groeber, F., Kahlig, A., Kleinhans, C. & Walles, H. Bioreactors in tissue engineering-principles, applications and commercial constraints. *Biotechnol. J.* **8**, 298–307 (2013).
420. Yu, X., Botchwey, E. A., Levine, E. M., Pollack, S. R. & Laurencin, C. T. Bioreactor-based bone tissue engineering: The influence of dynamic flow on osteoblast phenotypic expression and matrix mineralization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 11203–11208 (2004).
421. Lujan, T. J. *et al.* A novel bioreactor for the dynamic stimulation and mechanical evaluation of multiple tissue-engineered constructs. *Tissue Eng. - Part C Methods* **17**, 367–374 (2011).
422. Martin, I., Wendt, D. & Heberer, M. The role of bioreactors in tissue engineering. *Trends in Biotechnology* vol. 22 80–86 (2004).
423. Wang, J. *et al.* Ex vivo blood vessel bioreactor for analysis of the biodegradation of magnesium stent models with and without vessel wall integration. *Acta Biomater.* **50**, 546–555 (2017).
424. Lin, S. & Mequanint, K. Bioreactor-induced mesenchymal progenitor cell differentiation and elastic fiber assembly in engineered vascular tissues. *Acta Biomater.* **59**, 200–209 (2017).

425. Bjork, J. W. & Tranquillo, R. T. Transmural flow bioreactor for vascular tissue engineering. *Biotechnol. Bioeng.* **104**, 1197–1206 (2009).
426. Mcfetridge, P. S., Abe, K., Horrocks, M. & Chaudhuri, J. B. Vascular Tissue Engineering: Bioreactor Design Considerations for Extended Culture of Primary Human Vascular Smooth Muscle Cells. *ASAIO J.* **53**, 623–630 (2007).
427. Bilodeau, K., Couet, F., Boccafoschi, F. & Mantovani, D. Design of a perfusion bioreactor specific to the regeneration of vascular tissues under mechanical stresses. *Artif. Organs* **29**, 906–912 (2005).
428. Blaber, E., Marçal, H. & Burns, B. P. Bioastronautics: The influence of microgravity on astronaut health. *Astrobiology* vol. 10 463–473 (2010).
429. Hahn, M. S., McHale, M. K., Wang, E., Schmedlen, R. H. & West, J. L. Physiologic pulsatile flow bioreactor conditioning of poly(ethylene glycol)-based tissue engineered vascular grafts. *Ann. Biomed. Eng.* **35**, 190–200 (2007).
430. Niklason, L. E. *et al.* Functional arteries grown in vitro. *Science (80-.)*. **284**, 489–493 (1999).
431. Zhou, J., Li, Y. S. & Chien, S. Shear stress-initiated signaling and its regulation of endothelial function. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **34**, 2191–2198 (2014).
432. Wang, C. *et al.* A small diameter elastic blood vessel wall prepared under pulsatile conditions from polyglycolic acid mesh and smooth muscle cells differentiated from adipose-derived stem cells. *Biomaterials* **31**, 621–630 (2010).
433. Lemarié, L., Anandan, A., Petiot, E., Marquette, C. & Courtial, E.-J. Rheology, simulation and data analysis toward bioprinting cell viability awareness. *Bioprinting* **21**, e00119 (2021).
434. Pourchet, L. Développement d'une bio-encre pour la bioimpression 3D de tissus vivants : étude de la formulation et caractérisation du développement tissulaire. (2019).
435. Flaig, I. *et al.* In Vivo Analysis of the Biocompatibility and Immune Response of Jellyfish Collagen Scaffolds and its Suitability for Bone Regeneration. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, Vol.

- 21, Page 4518 **21**, 4518 (2020).
436. Pourchet, L. J. *et al.* Human Skin 3D Bioprinting Using Scaffold-Free Approach. *Adv. Healthc. Mater.* **6**, 1601101 (2017).
437. Pourchet, L. *et al.* Large 3D bioprinted tissue: Heterogeneous perfusion and vascularization. *Bioprinting* **13**, e00039 (2019).
438. Henrionnet, C. *et al.* Combining Innovative Bioink and Low Cell Density for the Production of 3D-Bioprinted Cartilage Substitutes: A Pilot Study. *Stem Cells Int.* **2020**, 2–14 (2020).
439. Henrionnet, C. *et al.* A Comparison of 3 Bioinks for 3D Bioprinting of Articular Cartilage. *Stem cell Regen. Med.* **80**, 81–87 (2021).
440. Chen, J. C., Castillo, A. B. & Jacobs, C. R. Cellular and Molecular Mechanotransduction in Bone. in *Osteoporosis: Fourth Edition* (eds. Marcus, R., Feldman, D., Dempster, D. W., Luckey, M. & Cauley, J. A.) 453–475 (Academic Press, 2013). doi:10.1016/B978-0-12-415853-5.00020-0.
441. Giorgi, C., Marchi, S. & Pinton, P. The machineries, regulation and cellular functions of mitochondrial calcium. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2018 1911 **19**, 713–730 (2018).
442. Trump BF *et al.* The role of calcium in cell injury : a review. *Scan. Electron Microsc.* **492**, 437–462 (1980).
443. Trump, B. F. & Berezsky, I. K. Calcium-mediated cell injury and cell death. *New Horizons Sci. Pract. Acute Med.* **4**, 139–150 (1996).
444. Meier, S., Hatton, T. & Wang, D. Cell death from bursting bubbles: role of cell attachment to rising bubbles in sparged reactors. *Biotechnol. Bioeng.* **62**, 468–478 (1999).
445. TMF. 3D Bioprinting - Overview of How Bioprinting Will Break Into Healthcare. *the medical futurist* <https://medicalfuturist.com/3d-bioprinting-overview/> (2021).
446. Mandon, C., Blum, L. & Marquette, C. 3D–4D Printed Objects: New Bioactive Material Opportunities. *Micromachines* **8**, 102 (2017).

447. Mandon, C. A., Blum, L. J. & Marquette, C. A. Adding Biomolecular Recognition Capability to 3D Printed Objects. *Anal. Chem.* **88**, 10767–10772 (2016).
448. Pellegrino, A. Bioprinting Alginate Structures using the FRESH Method. *Undergrad. Res. Scholarsh. Symp.* (2021).
449. Mirdamadi, E., Tashman, J. W., Shiwarski, D. J., Palchesko, R. N. & Feinberg, A. W. FRESH 3D Bioprinting a Full-Size Model of the Human Heart. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **6**, 6453–6459 (2020).
450. Grellier, M. *et al.* The effect of the co-immobilization of human osteoprogenitors and endothelial cells within alginate microspheres on mineralization in a bone defect. *Biomaterials* **30**, 3271–3278 (2009).
451. Darby, I. A., Laverdet, B., Bonté, F. & Desmoulière, A. Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing. *Clin. Cosmet. Investig. Dermatol.* **7**, 301 (2014).
452. Nagase, H. & Woessner, F. Matrix Metalloproteinases. *J. Biol. Chem.* **274**, 21491–21494 (1999).
453. Woessner, J. F. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB J.* **5**, 2145–2154 (1991).
454. Twining, S. S. Regulation of Proteolytic Activity in Tissues. *Biochem. Mol. Biol.* **29**, 315–383 (2008).
455. Dasu, M. R. K., Barrow, R. E., Spies, M. & Herndon, D. N. Matrix metalloproteinase expression in cytokine stimulated human dermal fibroblasts. *Burns* **29**, 527–531 (2003).
456. Reynolds, J. Collagenases and tissue inhibitors of metalloproteinases: a functional balance in tissue degradation. *Oral Dis.* **2**, 70–76 (1996).
457. Mauviel, A. Cytokine regulation of metalloproteinase gene expression. *J. Cell. Biochem.* **53**, 288–295 (1993).
458. Taraboletti, G. *et al.* Shedding of the Matrix Metalloproteinases MMP-2, MMP-9, and MT1-MMP as Membrane Vesicle-Associated Components by Endothelial Cells. *Am. J. Pathol.* **160**, 673 (2002).

459. Kiran, M. S., Kumar, V. B. S., Viji, R. I. & Sudhakaran, P. R. Temporal relationship between MMP production and angiogenic process in HUVEC. *Cell Biol. Int.* **30**, 704–713 (2006).
460. Sun, C. *et al.* Up-Regulated Expression of Matrix Metalloproteinases in Endothelial Cells Mediates Platelet Microvesicle-Induced Angiogenesis. *Cell. Physiol. Biochem.* **41**, 2319–2332 (2017).
461. Kiran, M. S., Viji, R. I., Kumar, S. V., Prabhakaran, A. A. & Sudhakaran, P. R. Changes in expression of VE-cadherin and MMPs in endothelial cells: Implications for angiogenesis. *Vasc. Cell* **3**, 6 (2011).
462. Davis, G. E. & Senger, D. R. Endothelial Extracellular Matrix. *Circ. Res.* **97**, 1093–1107 (2005).
463. Hinsbergh, V. W. M. van, Engelse, M. A. & Quax, P. H. A. Pericellular Proteases in Angiogenesis and Vasculogenesis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **26**, 716–728 (2006).
464. Griffith, C. K. *et al.* Diffusion limits of an in vitro thick prevascularized tissue. *Tissue Eng.* **11**, 257–266 (2005).
465. Chen, X. *et al.* Prevascularization of a fibrin-based tissue construct accelerates the formation of functional anastomosis with host vasculature. *Tissue Eng. - Part A* **15**, 1363–1371 (2009).
466. Villaschi, S. & Nicosia, R. F. Paracrine interactions between fibroblasts and endothelial cells in a serum-free coculture model: Modulation of angiogenesis and collagen gel contraction. *Lab. Investig.* **71**, 291–299 (1994).
467. Tomasek, J. J., Gabbiani, G., Hinz, B., Chaponnier, C. & Brown, R. A. Myofibroblasts and mechano: Regulation of connective tissue remodelling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* vol. 3 349–363 (2002).
468. Nguyen, D.-H. T. *et al.* Biomimetic model to reconstitute angiogenic sprouting morphogenesis in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**, 6712–6717 (2013).
469. Alturkistani, H. A., Tashkandi, F. M. & Mohammedsaleh, Z. M. Histological Stains: A Literature Review and Case Study. *Glob. J. Health Sci.* **8**, 72 (2016).
470. Therithal. Classifications of Connective Tissue. *Anatomy and physiology health*

- education* <http://www.pharmacy180.com/article/classifications-of-connective-tissue-3465/> (2019).
471. Toxicology Course on Tissues, Kinds of Tissues in the Body. http://www.toxicologyschools.com/Free_Toxicology_Course2/a23.htm.
472. Mike, M. Areolar Tissue: Definition, Functions, Structure & Location. *The education training* <https://theeducationtraining.com/areolar-tissue/> (2021).
473. O, S. *et al.* Regulation of endothelial cell branching morphogenesis by endogenous chemokine stromal-derived factor-1. *Blood* **99**, 2703–2711 (2002).
474. Chwalek, K., Tsurkan, M. V., Freudenberg, U. & Werner, C. Glycosaminoglycan-based hydrogels to modulate heterocellular communication in in vitro angiogenesis models. *Sci. Reports* **2014 41 4**, 1–8 (2014).
475. Dore-Duffy, P. & Cleary, K. Morphology and properties of pericytes. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* vol. 686 49–68 (2011).
476. Yonggang, M. *et al.* Myofibroblasts and the extracellular matrix network in post-myocardial infarction cardiac remodeling. *Eur. J. Physiol.* **466**, 1113–1127 (2014).
477. Cohen, T., Nahari, D., Cerem, L. W., Neufeld, G. & Levi, B.-Z. Interleukin 6 Induces the Expression of Vascular Endothelial Growth Factor. *J. Biol. Chem.* **271**, 736–741 (1996).
478. Zlotnik, A. & Yoshie, O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* **12**, 121–127 (2000).
479. RC, R., CC, G., MM, T. & FA, A. The CXCL8/IL-8 chemokine family and its receptors in inflammatory diseases. *Expert Rev. Clin. Immunol.* **10**, 593–619 (2014).
480. Vries, M., Wagenaar, A., Verbruggen, S., Molin, D. & Post, M. CXCL1 promotes arteriogenesis through enhanced monocyte recruitment into the peri-collateral space. *Angiogenes.* **2014 182 18**, 163–171 (2014).
481. Geiser, T., Dewald, B., Ehrenguber, M., Clark-Lewis, I. & Baggiolini, M. The interleukin-8-related chemotactic cytokines GRO alpha, GRO beta, and GRO gamma activate human neutrophil and basophil leukocytes. *J. Biol. Chem.* **268**, 15419–15424 (1993).

482. Bechara, C., Chai, H., Lin, P., Yao, Q. & Chen, C. Growth related oncogene-alpha (GRO-alpha): roles in atherosclerosis, angiogenesis and other inflammatory conditions - PubMed. *Med. Sci. Monit.* **13**, 87–90 (2007).
483. M, C. *et al.* Growth-regulated oncogene is pivotal in thrombin-induced angiogenesis. *Cancer Res.* **66**, 4125–4132 (2006).
484. KH, H., J, R. & KH, H. Monocyte chemoattractant protein-1-induced angiogenesis is mediated by vascular endothelial growth factor-A. *Blood* **105**, 1405–1407 (2005).
485. Kim, M. Y., Byeon, C. W., Hong, K. H., Han, K. H. & Jeong, S. Inhibition of the angiogenesis by the MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1) binding peptide. *FEBS Lett.* **579**, 1597–1601 (2005).
486. Fisher, G. *et al.* Interstitial Collagenase Is Required for Angiogenesis in Vitro. *Dev. Biol.* **162**, 499–510 (1994).
487. Sang, Q. & Xiang, A. Complex role of matrix metalloproteinases in angiogenesis. *Cell Res.* **8**, 171–177 (1998).
488. Thomas, P. Détermination du rôle de l'uPAR dans l'angiogenèse MÉMOIRE PRÉSENTÉ PAR.
489. Del Rosso, M. uPAR in angiogenesis regulation. *Vasc. Biol.* **117**, 3941–3943 (2011).
490. Uhrin, P. & Breuss, J. uPAR: a modulator of VEGF-induced angiogenesis. *Cell Adh. Migr.* **7**, 23–26 (2013).
491. Prager, G. *et al.* Vascular endothelial growth factor receptor-2-induced initial endothelial cell migration depends on the presence of the urokinase receptor. *Circ. Res.* **94**, 1562–1570 (2004).
492. Montuori, N. & Ragno, P. Role of uPA/uPAR in the Modulation of Angiogenesis. *Chem. Immunol. Allergy* **99**, 105–122 (2014).
493. Hao, X. *et al.* Angiogenic effects of sequential release of VEGF-A165 and PDGF-BB with alginate hydrogels after myocardial infarction. *Cardiovasc. Res.* **75**, 178–185 (2007).
494. Benjamin, L. & Hemo, I. A plasticity window for blood vessel remodelling is defined by

- pericyte coverage of the preformed endothelial network and is regulated by PDGF-B and VEGF. *Development* **125**, 1591–1598 (1998).
495. Korff, T., Kimmina, S. & Martiny-Baron, G. Blood vessel maturation in a 3-dimensional spheroidal coculture model: direct contact with smooth muscle cells regulates endothelial cell quiescence and abrogates VEGF responsiveness. *FASEB J.* **15**, 447–457 (2001).
496. Ishikawa, F. *et al.* Identification of angiogenic activity and the cloning and expression of platelet-derived endothelial cell growth factor. *Nature* **338**, 557–562 (1989).
497. Unemori, E., Ferrara, N., Bauer, E. & Amento, E. Vascular endothelial growth factor induces interstitial collagenase expression in human endothelial cells. *J. Cell. Physiol.* **153**, 557–562 (1992).

PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES

Bioinspired Multi-Activities 4D Printing Objects: A New Approach Toward Complex Tissue Engineering

Chloé D. Devillard, Céline A. Mandon, Simon A. Lambert, Loïc J. Blum, and Christophe A. Marquette*

4D printing is an innovative approach which might in a near future lead to the achievement of highly complex smart materials. The authors describe a new strategy for the achievement of 4D printed objects with multiple biological activities. These activities are generated through the entrapment, during 3D printing, of two distinct enzymes (alkaline phosphatase and thrombin). These two enzymes give then the ability to the 4D printed object to generate bioactivities useful for in vitro tissue engineering. Indeed, it is shown that the entrapped alkaline phosphatase enables the localized and pre-programmed calcification of some 3D object parts while the diffusion of thrombin from the object permits the formation of fibrin biofilm (including living cells) directly at the surface of 3D object. Both activities and enzyme behavior within the 4D printed hydrogel are characterized through enzymatic measurements, microscopy, magnetic resonance imaging (MRI), and cell seeding.

1. Introduction

Today, one of the main scientific challenges of 3D printing for life science is to succeed in mimicking biological functions useful for tissue engineering. Indeed, recapitulating complex shapes with simple cell composition and functions is already reachable using 3D printing and bioprinting. It is thus possible to generate human full skin, cartilage, retina, and blood vessels.^[1–4] Nevertheless, enabling access to complex tissues' organization with multiple components such as vascularization and calcification is still challenging. It is then of utmost importance to evaluate the capacity of 3D printing to generate self-evolving materials, also called "intelligent material"

that can, in the proper biological or biochemical environment, self-generate biological functions.

In 2013, Skylar Tibbitts, co-director and founder of the Self-Assembly Laboratory hosted by Massachusetts Institute of Technology's (MIT) International Design Center, introduced and defined the concept of 4D printing: "The 4D concept has added the dimension of time and describes the materials that can be built by 3D printing so that they react later and change shape in response to an external stimulus such as heat or moisture".^[5,6] The Hilbert Gene 1 object, self-assembling in contact with water, is an example of the application of this concept.^[6] Similarly, the work on 4D printing by Jennifer Lewis and her team at the Wyss Institute for Biologically Inspired Engineering (Harvard University)

has resulted in the design of hydrogel-based floral architectures, inspired by botanical systems, which 3D structure change during moisturizing.^[7]

The 3d.FAB (Fabric of Advanced Biology) laboratory works have extend Skylar Tibbitts' initial definition, limited to 3D printed objects which geometry only evolved as a function of time and environment, by introducing in a 3D object the concept of physical, chemical, biological, or biochemical properties.^[8,9] It was then permitted to envision the synthesis of 3D materials entrapping biologically active molecules such as enzymes or antibodies, in an organized manner and at specific locations within a 3D object. The 3D printer used for this demonstration was a stereo-lithography 3D printer using digital light processing (DLP) and an ink formulation enabling the printing of hydrogel-based high-resolution 3D objects (6 μm Z-resolution 50 μm X- and Y-resolution). The printer conceptual view together with the chemistry of the photo-polymer used are described in **Figure 1**. In this present report, we will propose for the first time a multi-activities 4D printed object as an attempt to generate a biomimetic construct of vascularized alveolar bone. To attribute multiple biological activities to the 3D object, different enzymes were directly integrated during the 3D printing process: alkaline phosphatase, chosen for its capacity to trigger calcification reaction^[10–12] and thrombin, chosen for its ability to trigger fibrin network formation.^[13–15] This approach will allow us to demonstrate that 4D printing is the groundbreaking approach toward the achievement of complex bioactive 3D printed materials.

C. D. Devillard, Dr. C. A. Mandon, Prof. L. J. Blum,
Dr. C. A. Marquette
Institut de Chimie et Biochimie Moléculaires et Supramoléculaires
ICBMS UMR 5246 CNRS, Université de Lyon
Université Lyon 1, CNRS, INSA Lyon
CPE Lyon, 43 bd du 11 Novembre 1918
69622 Villeurbanne Cedex, France
E-mail: christophe.marquette@univ-lyon1.fr

Dr. S. A. Lambert
Univ. Lyon, INSA-Lyon
Université Claude Bernard Lyon 1
UJM-Saint Etienne, CNRS, Inserm, CREATIS UMR 5220, U1206,
F-69616 Lyon, France

DOI: 10.1002/biot.201800098



Vascular Tissue Engineering: Challenges and Requirements for an Ideal Large Scale Blood Vessel

Chloé D. Devillard and Christophe A. Marquette*

3d.FAB, CNRS, INSA, Univ Lyon, CPE-Lyon, UMR5246, ICBMS, Université Lyon 1, Villeurbanne Cedex, France

OPEN ACCESS

Edited by:

Bruce Alan Bunnell,
University of North Texas Health
Science Center, United States

Reviewed by:

Bin Duan,
University of Nebraska Medical
Center, United States

Vahid Serpooshan,

Emory University, United States

*Correspondence:

Christophe A. Marquette
christophe.marquette@univ-lyon1.fr

Specialty section:

This article was submitted to
Tissue Engineering and Regenerative
Medicine,
a section of the journal
Frontiers in Bioengineering and
Biotechnology

Received: 07 June 2021

Accepted: 20 September 2021

Published: 04 October 2021

Citation:

Devillard CD and Marquette CA (2021)
Vascular Tissue Engineering:
Challenges and Requirements for an
Ideal Large Scale Blood Vessel.
Front. Bioeng. Biotechnol. 9:721843.
doi: 10.3389/fbioe.2021.721843

Since the emergence of regenerative medicine and tissue engineering more than half a century ago, one obstacle has persisted: the *in vitro* creation of large-scale vascular tissue (>1 cm³) to meet the clinical needs of viable tissue grafts but also for biological research applications. Considerable advancements in biofabrication have been made since Weinberg and Bell, in 1986, created the first blood vessel from collagen, endothelial cells, smooth muscle cells and fibroblasts. The synergistic combination of advances in fabrication methods, availability of cell source, biomaterials formulation and vascular tissue development, promises new strategies for the creation of autologous blood vessels, recapitulating biological functions, structural functions, but also the mechanical functions of a native blood vessel. In this review, the main technological advancements in bio-fabrication are discussed with a particular highlights on 3D bioprinting technologies. The choice of the main biomaterials and cell sources, the use of dynamic maturation systems such as bioreactors and the associated clinical trials will be detailed. The remaining challenges in this complex engineering field will finally be discussed.

Keywords: bioprinting, blood vessel, vascular tissue engineering, bioreactor, three-layered blood vessel, dynamic maturation

1 INTRODUCTION

After many years of research in the field of engineering and regenerative medicine, an obstacle remains: the design and construction of vascularized large-scale *in vitro* tissues (>1 cm³) for biological studies and transplantation. As a result, the demand for blood vessels produced through bioengineering continues to grow and current options for vascular design remain limited. This makes this area a real challenge with advanced requirements such as the distribution, organization, adhesion, migration and maturation of living cells inside the constructs; the manufacturing or obtaining of a functional extracellular matrix (ECM); the development of a non-thrombogenic endothelium (Seifu et al., 2013).

A large blood vessel is organized as three concentric layers: the tunica intima, the media and the adventitia. These layers are composed of endothelial cells (ECs), smooth muscle cells (SMCs) and fibroblasts (FBs), respectively, trapped in a highly organized extracellular matrix (ECM) mainly composed of type I collagen, type III collagen and elastin.

The 1950s witnessed the appearance for the first time of tissue-engineering vascular grafts (TEVG) intended to replace occluded arterial vessels following surgical complications. They had the advantage of being recourse to the frequent shortage of allogenic transplants and made it possible to reduce the immunological rejection following transplants of large vessels of animal origin. However,

COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES

C. D. Devillard, E-J. Courtial, E. Petiot, C. A. Marquette, Routine checking for cells viability in deposition 3D printing. *World Congress of Advanced Biomaterials and Tissue Engineering*, 17th-18th October 2018, Rome (Italy). Oral communication.

C. D. Devillard, C. A. Marquette, Vascular tissue engineering 4D bioprinting. *GDR Réparer l'Humain, Interface cellule-environnement*, 7th december 2018, Lyon (France). Oral communication.

C. D. Devillard, E-J. Courtial, E. Petiot, C. A. Marquette, Routine checking for cells viability in deposition 3D printing. *Bioregate Forum*, 12th-13th December 2018, Nantes (France). Oral communication.

C. D. Devillard, C. A. Marquette, Vascular tissue engineering 4D bioprinting. *3d.FAB platform, 3rd Scientific Day*, 18th December 2018, Lyon (France). Oral communication.

C. D. Devillard, C. A. Marquette, 3D Bioprinting of Human Tissue. *VIII^{ème} congrès de la Société Française de Bioingénierie Cellulaire et Tissulaire*, 5th June 2019, Amiens (France). Oral communication.

C. D. Devillard, C. A. Marquette, 4D Bioprinting of Vascular Tissue. *TERMIS-EU Workshop*, 19th-21th August 2019, Nantes (France). Oral communication.

C. D. Devillard, C. A. Marquette, 4D Bioprinting of Vascular Tissue. *3d.FAB platform, 4rd Scientific Day*, 10th January 2020, Lyon (France). Poster communication.

C. D. Devillard, C. A. Marquette, Development of human vascular tissue thanks to an advanced biotechnology: the bioprinting, *Journée de L'Ecole Doctorale Interdisciplinaire Sciences-Santé*. 11th November 2020, Lyon (France). Oral communication.

C. D. Devillard, C. A. Marquette, The role of cellular communications on the development of 3D bioprinting tissue. *3d.FAB platform, 6rd Scientific Day*, 9th July 2021, Lyon (France). Oral communication.

Résumé

Développement de tissus vasculaires par la technologie de bioimpression 3D

Cette thèse a pour objectif de développer un tissu vasculaire par la méthode de bioimpression 3D.

Dans un premier temps, une bioencre composée de trois biomatériaux naturels : la gélatine, l'alginate et le fibrogène, et une solution de consolidation ont été développées et optimisées.

Afin de développer un tissu vasculaire, plusieurs approches technologiques ont été présentées suivant un cahier des charges bien défini. Ces approches de biofabrications macrovasculaires ont été divisées en deux catégories : la biofabrication vasculaire tubulaire et la biofabrication vasculaire plane. Les méthodes de bioimpression 3D par microextrusion à 1 et 3 extrudeurs, la bioimpression 3D coaxiale et triaxiale, la bioimpression 3D en milieu contraint, l'impression 4D par diffusion enzymatique, la bioimpression 3D par enroulement, ont ainsi été étudiées pour répondre à la création d'une structure tubulaire multicouche, de taille centimétrique. La bioimpression 3D par microextrusion et la bioimpression 4D ont quant à elles été présentées pour répondre à l'approche d'ingénierie vasculaire plane, se focalisant uniquement sur l'architecture et la composition complexe de la paroi vasculaire (*intima, media, adventice*).

La dernière partie de ces travaux étudie l'ingénierie microvasculaire, notamment l'impact des communications entre les fibroblastes et les cellules endothéliales à l'intérieur d'un environnement 3D, sur le développement d'un tissu vascularisé *in vitro*. Le procédé de biofabrication développé durant cette thèse a permis le développement rapide, en 7 jours de culture, d'une néovascularisation par auto-assemblage des cellules endothéliales à l'intérieur d'une matrice extracellulaire dense et néosynthétisée par les fibroblastes. Des caractérisations histologiques ont mis en évidence la présence d'une microvascularisation organisée, la technologie de microscopie électronique à transmission a permis de caractériser la formation de fibres de collagène et d'élastine sécrétées par les fibroblastes et une étude de surnageant de culture de nos tissus bioimprimés a révélé la présence significative de 11 protéines impliquées dans le processus angiogénique et sécrétées par les cellules présentes en culture 3D à l'intérieur du tissu, permettant ainsi le remodelage d'un tissu conjonctif vascularisé.

Abstract

Development of 3D bioprinting vascular tissues

This thesis focuses on the development of a 3D bioprinting vascular tissue.

As a first step, a bioink composed of three natural biomaterials: gelatin, alginate and fibrinogen, and an ideal consolidation solution were developed and optimized.

In order to develop vascular tissue, several technological approaches have been presented, following well-defined specifications. These macrovascular biofabrication approaches have been divided into two categories: tubular vascular biofabrication and planar vascular biofabrication. The microextrusion 3D bioprinting with 1 and 3 extruders, coaxial and triaxial 3D bioprinting, support bath 3D bioprinting (FRESH), 4D printing by enzymatic diffusion and rolling 3D bioprinting, have been studied to respond to the creation of a large multilayer tubular structure. Microextrusion 3D bioprinting and 4D bioprinting were introduced to respond to the planar vascular engineering approach, focusing only on the architecture and complex composition of the vascular wall (*intima, media, adventitia*).

The last part of this thesis studies microvascular engineering with the impact of fibroblasts and endothelial cells communications within a 3D environment, on the *in vitro* development of vascularized tissue. The biofabrication process developed during this thesis allowed the rapid development, in 7 culture days, of a neovascularization by self-assembly of endothelial cells inside a dense extracellular matrix neosynthesized by fibroblasts. Histological characterizations have highlighted the presence of organized microvascularization, transmission electron microscopy technology has made it possible to characterize the formation of collagen and elastin fibers secreted by fibroblasts and a study of the culture supernatant of bioprinted tissue revealed the significant presence of 11 proteins involved in the angiogenic process and secreted by cells present in 3D culture inside the tissue, thus allowing remodeling of vascularized connective tissue.

Discipline

Biotechnologie

Mots clés

Bioimpression 3D, bioencre, communication cellulaire, microvascularisation, tissu vasculaire, vaisseau sanguin

Laboratoire

Génie Enzymatique Membranes Biomimétiques et Assemblages Supramoléculaires (GEMBAS)
Institut de Chimie et Biochimie Moléculaires et Supramoléculaires (ICBMS)
UMR 5246 – Université de Lyon – Université Claude Bernard Lyon 1 – CNRS
Bâtiment LEDERER, 1 rue Victor Grignard, 69622 Villeurbanne Cedex, France.