



**HAL**  
open science

# Modèles de vaisseaux sanguins sur puce pour l'étude des fonctions de la barrière endothéliale

Elise Delannoy

► **To cite this version:**

Elise Delannoy. Modèles de vaisseaux sanguins sur puce pour l'étude des fonctions de la barrière endothéliale. Micro et nanotechnologies/Microélectronique. Université de Lille, 2021. Français. NNT : 2021LILUN020 . tel-03895609

**HAL Id: tel-03895609**

**<https://theses.hal.science/tel-03895609v1>**

Submitted on 13 Dec 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.



THESE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE  
L'UNIVERSITE DE LILLE

École doctorale Sciences de l'ingénierie et des systèmes  
*Spécialité Micro et Nanotechnologies, Acoustique et Télécommunications*

Présentée et soutenue par

**Elise DELANNOY**

*Le 13 Décembre 2021*

Modèles de vaisseaux sanguins sur puce pour  
l'étude des fonctions de la barrière endothéliale

**Président du jury :** Pr. Vincent THOMY, Professeur des universités, IEMN, Université de Lille

**Rapportrices :** Dr. Julie GAVARD, Directrice de recherche INSERM, Université de Nantes  
Pr. Séverine LE GAC, Associate Professor, Twente University, Pays-Bas

**Examineurs :** Dr. Maria Carla PARRINI, Ingénieure de recherche, Institut Curie, Paris  
Dr. Anne Marie GUE, Directrice de recherche CNRS, LAAS, Toulouse

**Directeurs :** Dr. Fabrice SONCIN, Directeur de recherche INSERM, LIMMS, Université de Lille  
Dr. Dominique COLLARD, Directeur de recherche CNRS, LIMMS, Université de Lille

**Encadrant :** Dr. Anthony TREIZEBRE, Maître de conférences, IEMN, Université de Lille



# Blood vessels on chip models for the study of endothelial barrier functions

PhD dissertation by

**Elise DELANNOY**



# Résumé

Le système vasculaire sanguin est un réseau de conduits qui transporte le sang à travers l'organisme. Par leurs fonctions de transport du sang, les vaisseaux sanguins jouent des rôles importants dans l'apport en oxygène et en nutriments aux tissus et l'évacuation des déchets métaboliques. Ainsi, les vaisseaux sanguins forment une barrière plus ou moins perméable qui permet ces échanges et qui régule également la réponse immunitaire. Le microenvironnement joue également un rôle important dans la fonctionnalité des vaisseaux. La composition et les propriétés physiques de la matrice extracellulaire et les cellules périvasculaires orientent fortement la physiologie des cellules endothéliales et influencent la barrière vasculaire. Dans le cadre de l'inflammation, l'hyperperméabilité vasculaire est un problème de santé publique et constitue un effet secondaire bien connu de certains traitements, notamment anti-cancéreux.

Pour étudier ces phénomènes vasculaires, nous proposons des nouveaux modèles combinant la microfabrication, l'ingénierie tissulaire et les technologies microfluidiques permettant de construire des organes sur puce. Les organes sur puce sont un tournant technologique permettant de répondre à des questions biologiques complexes. Ils visent à combler le fossé entre des tests 2D *in vitro* trop peu représentatifs de l'*in vivo* et des modèles animaux coûteux, chronophages et spécifiques aux espèces. Nous avons conçu des dispositifs de vaisseaux sur puce dans lesquels un canal initial a été créé dans un hydrogel à base de collagène en utilisant des approches microfluidiques qui reposent soit sur les propriétés d'écoulement laminaires, la focalisation en flux, soit sur les propriétés viscoélastiques des solutions en microcanaux, la digitation visqueuse. Cette dernière technique a particulièrement été développée et a permis de former un canal initial qui constitue la future lumière du vaisseau qui a été ensemencé avec des cellules endothéliales primaires humaines. Celles-ci ont formé une monocouche confluyente et cohésive, de manière à reproduire la face interne d'un vaisseau sanguin. Cette technique a été réalisée une seule ou deux fois de suite et a ainsi permis de varier, selon le canal utilisé, le diamètre du vaisseau final et aussi de créer une double couche cellulaire. L'intégrité de la barrière endothéliale a été étudiée par l'évaluation de la qualité de la répartition de la *vascular endothelial-cadherin* au niveau des jonctions adhérentes et de *zona-occludens-1* pour les jonctions serrées. D'autre part, la perméabilité de l'endothélium a été étudiée par la mise en place d'une approche de vidéomicroscopie pour quantifier la diffusion en temps réel de dextran-fluorescent à travers l'endothélium des vaisseaux. La capacité d'activation des cellules endothéliales par des cytokines pro-inflammatoires et leur capacité à induire l'adhérence de cellules immunitaires et de cellules cancéreuses à la face interne de la lumière des vaisseaux ont été également évaluées. L'approche biomimétique de ce modèle a été enrichie en formant deux couches cellulaires distinctes et concentriques constituées de cellules endothéliales et de fibroblastes périvasculaires afin d'approcher encore plus fidèlement la structure et la composition d'un vaisseau sanguin naturel et d'observer l'influence des interactions entre les deux types cellulaires sur la perméabilité des vaisseaux. Ainsi, la présence de fibroblastes périvasculaires a significativement renforcé la barrière endothéliale, notamment en réponse à la thrombine. Enfin, ces vaisseaux-sur-puce ont été conçus dans un format standardisé de plaque multi-puits dans le but d'être utilisés pour le criblage robotisé et à haut débit de médicaments.

Nous proposons ici des dispositifs adaptés au criblage de molécules effectrices de l'activation et de la perméabilité vasculaire, notamment dans le cadre des traitements anti-cancéreux.

**Mots clés:** Microfluidique, Vaisseaux sanguins, Hydrogel, Perméabilité vasculaire, Cancer

# Abstract

The blood vessel system is made of a network of conduits that transport blood through the organism. Via the transportation of blood, blood vessels play crucial roles in oxygen and nutrient supply to tissues and in the removal of metabolic waste. Therefore, blood vessels act as a barrier which allows these exchanges and also participate in the immune response. The microenvironment plays an important role in the functions of blood vessels. In particular, the composition and the physical properties of the extracellular matrix and perivascular cells strongly orient the physiology of endothelial cells and of the vascular barrier. In the context of inflammation, vascular hyperpermeability is a public health concern and is a well-known side effect of some cancer treatments.

To study these vascular phenomena, we propose a new model combining microfabrication, tissue engineering and microfluidic technologies to build organs-on-a-chip. Organs on chips are a technological turning point allowing to answer complex biological questions. They aim to bridge the gap between overly simple 2D *in vitro* tests, that do not accurately represent the *in vivo* conditions, and expensive, time-consuming, species-specific animal models. We have designed vessel-on-chip devices in which an initial channel is created in a collagen-based hydrogel using microfluidic approaches that rely either on laminar flows using flow focusing, or on the viscoelastic properties of solutions in microchannels using viscous finger patterning. The latter has been developed in order to create an initial channel which constituted the future lumen of the vessel which was seeded with human primary endothelial cells. These cells then formed a confluent and cohesive monolayer, so as to reproduce the internal face of a blood vessel. This technique was carried out once or twice in a row, thus making it possible to change, depending on the device used, the diameter of the final vessel and also to create a double cell layer. The integrity of the endothelial barrier was studied by evaluating the quality of the distribution of the vascular endothelial-cadherin at the level of the adherens junctions, and of zona-occludens-1 for the tight junctions. Furthermore, the permeability of the endothelium was studied by setting up a videomicroscopy approach to quantify in real-time the diffusion of a fluorescent dextran through the endothelium of the vessels. The ability to activate endothelial cells by pro-inflammatory cytokines and their ability to induce the adhesion of immune cells and of cancer cells to the inner surface of the lumen of the vessels were evaluated. The biomimetic approach of this model was enriched by forming two distinct and concentric cell layers made up of endothelial cells and of perivascular fibroblasts in order to mimic more closely the structure and composition of a natural blood vessel and to observe the influence of interactions between the two cell types on the permeability of vessels. The presence of perivascular fibroblasts significantly strengthened the endothelial barrier, in particular in response to thrombin. Finally, these vessels-on-a-chip were designed in a standardized multi-well plate format for later use in robotized, high-throughput drug screening.

We propose here devices which are suitable for screening molecules that modulate vascular activation and permeability, particularly in the context of anti-cancer treatments.

**Key words:** Microfluidics, Blood vessel, Hydrogel, Vascular permeability, Cancer



# Remerciements

Lorsque j'ai commencé ma thèse, nombreux sont ceux qui ont été surpris ou amusés de mon choix. Ils connaissaient ma personnalité passionnée, mais se demandaient si l'environnement du laboratoire conviendrait à mon épanouissement personnel. Aujourd'hui, je peux le dire sans l'ombre d'un doute, ces années ont été à la fois la source d'une stimulation intellectuelle sans précédent, mais également une véritable aventure humaine qui me laissera des souvenirs précieux. J'aimerais donc remercier celles et ceux qui ont croisé ma route et qui ont contribué à la richesse de ces trois années.

Tout d'abord, merci aux deux rapportrices de ce travail Dr. Julie Gavard et Pr. Séverine Le Gac pour leur analyse du manuscrit et leurs retours encourageants. Je remercie également chaleureusement l'ensemble des membres du jury d'avoir accepté d'évaluer ma thèse et pour les échanges scientifiques très intéressants qui en ont découlé.

J'adresse un immense et très sincère merci à ceux qui m'ont accompagnée à chaque étape de ce travail, Fabrice Soncin mon directeur de thèse et Anthony Treizebre mon encadrant. Ils m'ont tous deux apporté beaucoup de soutien tout en me laissant forger mon indépendance. Merci à Fabrice pour ses mots toujours justes, sa disponibilité et sa façon si humaine de mener son équipe. Qui aurait cru qu'un biologiste et une ingénieure en physique parviendraient si bien à travailler ensemble ? Je le remercie d'avoir été un véritable mentor, me laissant l'espace de faire mes propres choix et d'explorer mes idées tout en me guidant à travers les écueils cachés sur ma route. Sans oublier le petit chocolat rituel à la fin de chaque pause-café qui me manquera beaucoup. Merci à Anthony pour sa bonne humeur rayonnante, son dynamisme et surtout son ingéniosité, « ce système n'existe pas ? Aucun problème, nous allons le fabriquer ! ». Il m'a montré que les seules limites qui existent sont celles que l'on se fixe (et celles de la Physique accessoirement, mais c'est un détail). Alors un grand merci à tous les deux pour votre humanité, pour l'émulation scientifique dont vous êtes moteur, et pour votre engagement auprès de vos étudiants dont j'ai eu la chance de faire partie.

Un grand et chaleureux merci également à l'équipe Vaisseaux : Géraldine, Juliette et Alice. Je les remercie bien évidemment pour leur aide à la paillasse, mais aussi pour la relecture de ce manuscrit. Cela a été un réel plaisir de travailler avec vous, toujours dans la bonne humeur (ou presque), avec les expressions d'un autre temps de Juliette et Géraldine jamais bien loin de son plaid. Je souhaite le meilleur à Alice qui devrait prendre la suite de ce projet. J'espère qu'il lui apportera le même épanouissement qu'à moi avec quelques casse-têtes en moins.

Plus largement un grand merci aux membres de l'équipe SMMiL-E, dirigée par Cagatay Tarhan dans un premier temps puis par Dominique Collard, pour leurs remarques pertinentes lors des réunions de laboratoire et pour leur aide technique sur mon projet. J'ai forcément une pensée pour Quentin qui a vécu cette aventure en même temps que moi, je le remercie pour sa bonne humeur inépuisable et le soutien qu'il m'a apporté. Je suis également reconnaissante à l'équipe BIOMEMS de l'IEMN dirigée par Vincent Thomy pour son accueil au début de ma thèse et pour nos échanges toujours agréables.

Je remercie chaleureusement l'équipe de Samuel Meignan du Centre Oscar Lambret avec qui j'ai partagé le laboratoire de culture cellulaire pour son accueil et sa disponibilité. Je garderai un très bon souvenir de nos moments de convivialité autour des pauses-café qui ont malheureusement disparu après l'arrivée du COVID. Merci également à l'IRCL de nous avoir accueillis dans leurs locaux et de nous avoir soutenus dans nos projets. Un immense merci à Michel Marissal qui a transformé de A à Z des salles de stockages plus ou moins abandonnées en laboratoires tout neufs où j'ai pu travailler sur mon projet.

Merci aux plateformes d'imageries de l'Université de Lille et de l'institut de Biologie de Lille et plus particulièrement à Corentin Spriet, Sophie Salome-Desnoullez et Elisabeth Werkmeister de m'avoir formée à l'imagerie confocale et de m'avoir fourni l'accès à leur matériel. Merci également au réseau Renatech pour l'accès à la salle blanche de l'IEMN et ses équipements de pointe en matière de microfabrication.

Je souhaite remercier les personnes grâce auxquelles j'ai pu valoriser mon travail de thèse via des collaborations scientifiques stimulantes, l'équipe de Suman Mitra et celle de David Tulasne de l'institut OncoLille et l'équipe d'Anna-Rita Cantelmo de l'EGID.

Ces trois années n'auraient pas été possibles sans le financement de mon salaire par la région Hauts-de-France et l'Union Européenne à travers le fond FEDER, par la fondation ISITE ULNE, par HCS Pharma ainsi que l'IEMN pour la fin de mon contrat. Merci également au Cancéropôle Nord-Ouest, la Ligue contre le cancer et la Fondation ARC qui nous ont permis de financer la réalisation de ce projet.

Enfin, d'un point de vue personnel j'ai une reconnaissance immense pour ma famille qui m'a soutenue à chaque étape de ma vie et toujours encouragée à poursuivre mes rêves et mes idées. Merci à eux d'avoir essayé de comprendre le cœur de mon travail même s'il était bien loin de leur domaine d'expertise. Merci aussi à mon autre famille, celle du rugby, qui écarquillait grand les yeux quand je tentais d'expliquer mon sujet de thèse, mais qui m'a appris la persévérance et l'abnégation, mais surtout qu'il n'existe pas d'aventure collective sans aventure humaine. Je les remercie d'avoir été une soupape de décompression et un véritable moteur dans ma vie. La poursuite de l'excellence scientifique en même temps que l'excellence sportive n'a pas été de tout repos, mais cela m'a permis de m'épanouir pleinement.

En conclusion, je renouvelle ma gratitude à ceux qui ont partagé cette aventure avec moi, en espérant n'avoir laissé personne de côté. Et je finirais avec un trait d'esprit trouvé un jour qui m'a fait beaucoup sourire : « Un doctorat, c'est comme essayer de faire un puzzle de 100 000 pièces sans la boîte. Et les pièces changent tout le temps de couleur et de forme. Et la salle est en feu. ». Il faut croire que, finalement, je n'ai retenu que le meilleur de ces années.





# Table des matières

<b>RÉSUMÉ</b> .....	<b>5</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>7</b>
<b>REMERCIEMENTS</b> .....	<b>9</b>
<b>TABLE DES MATIERES</b> .....	<b>13</b>
<b>LISTE DES ABREVIATIONS</b> .....	<b>17</b>
<b>CHAPITRE 1 : INTRODUCTION</b> .....	<b>19</b>
1.1 <b>ESSOR DES ORGANES SUR PUCES</b> .....	<b>21</b>
1.1.1 <i>Origine et pertinence des organes sur puce</i> .....	<b>21</b>
1.1.2 <i>Techniques de fabrication</i> .....	<b>21</b>
1.1.2.1    Création d'une puce microfluidique .....	<b>22</b>
1.1.2.2    Choix de la matrice extracellulaire .....	<b>23</b>
1.1.2.3    Architecture des hydrogels au sein des OoCs.....	<b>25</b>
1.1.3 <i>Principales caractéristiques des organes sur puces</i> .....	<b>28</b>
1.1.3.1    Sources cellulaires .....	<b>28</b>
1.1.3.2    Disposition 3D des cellules .....	<b>29</b>
1.1.3.3    Perfusion en flux laminaire.....	<b>30</b>
1.1.3.4    Un microenvironnement dynamique et sensible .....	<b>31</b>
1.1.4 <i>Reproduire les fonctions des organes</i> .....	<b>32</b>
1.1.5 <i>Vers un humain sur puce</i> .....	<b>33</b>
1.1.6 <i>Enjeux de la vascularisation et de l'étude des vaisseaux</i> .....	<b>36</b>
1.2 <b>REPRODUIRE DES TUBES ENDOTHELIALISES</b> .....	<b>37</b>
1.2.1 <i>Méthodes de fabrication des vaisseaux</i> .....	<b>37</b>
1.2.1.1    Méthodes classiques .....	<b>37</b>
1.2.1.2    Théorie des écoulements dans des canaux microfluidiques .....	<b>40</b>
1.2.1.3    Focalisation hydrodynamique d'hydrogels.....	<b>42</b>
1.2.1.4    Modelage par digitation visqueuse ou viscous finger patterning.....	<b>44</b>
1.2.2 <i>Perfusion</i> .....	<b>48</b>
1.3 <b>MODELE BIOLOGIQUE DE VAISSEAUX SUR PUCE</b> .....	<b>51</b>
1.3.1 <i>Le réseau vasculaire</i> .....	<b>51</b>
1.3.1.1    Structure des vaisseaux sanguins .....	<b>52</b>
1.3.2 <i>Structure de l'endothélium vasculaire</i> .....	<b>53</b>
1.3.2.1    Les jonctions inter-endothéliales.....	<b>55</b>
1.3.3 <i>Fonctions de l'endothélium des vaisseaux sanguins</i> .....	<b>56</b>
1.3.3.1    Endothélium et réponse inflammatoire .....	<b>56</b>
1.3.3.2    La perméabilité vasculaire .....	<b>58</b>
1.3.4 <i>Modèles fonctionnels de vaisseaux sur puce</i> .....	<b>59</b>
1.3.4.1    Modèles d'activation vasculaire .....	<b>59</b>
1.3.4.2    Modèles de perméabilité vasculaire.....	<b>61</b>
1.3.4.3    Intégration de cellules périvasculaires dans les modèles .....	<b>65</b>
1.4 <b>CHALLENGE DE LA MONTEE EN ECHELLE</b> .....	<b>66</b>
<b>CHAPITRE 2 : MATERIEL ET METHODES</b> .....	<b>69</b>
2.1 <b>MICROFABRICATION</b> .....	<b>71</b>

2.1.1	<i>Moules en résine par photolithographie</i> .....	71
2.1.2	<i>Moule en silicium par gravure à ions réactifs</i> .....	72
2.1.3	<i>Moule en aluminium au format SBS</i> .....	74
2.1.4	<i>Moulage du Polydimethylsiloxane (PDMS)</i> .....	74
2.1.5	<i>Assemblage des puces</i> .....	74
2.2	CULTURE CELLULAIRE .....	75
2.3	CREATIONS DES VAISSEaux PAR FOCALISATION HYDRODYNAMIQUE .....	75
2.4	CREATION DES VAISSEaux PAR <i>VISCOUS FINGER PATTERNING (VFP)</i> .....	77
2.5	TEST DE PERMEABILITE .....	77
2.6	TEST DE REPOSE EN ACTIVATION .....	78
2.7	IMMUNOFLUORESCENCE ET MICROSCOPIE.....	78
2.8	ANALYSE DE L'EXPRESSION DE GENES PAR RT-QPCR .....	79
<b>CHAPITRE 3 : RESULTATS</b> .....		<b>81</b>
3.1	ELABORATION D'UN MODELE DE BARRIERE ENDOTHELIALE EN PUCE MICROFLUIDIQUE.....	83
3.1.1	<i>Technique de focalisation hydrodynamique</i> .....	83
3.1.1.1	Mise en place du procédé - essais initiaux .....	83
3.1.1.2	Focalisation hydrodynamique d'hydrogels.....	85
3.1.1.3	Évolution de la géométrie des puces microfluidiques .....	94
3.1.1.4	Ensemencement des cellules endothéliales .....	97
3.1.1.5	Bilan de l'approche de focalisation hydrodynamique .....	99
3.1.2	<i>Création de vaisseaux sanguins sur puce par viscous finger patterning</i> .....	101
3.1.2.1	Choix de la méthode de VFP.....	101
3.1.2.2	Choix de la taille des canaux.....	103
3.1.2.3	Ensemencement des cellules.....	104
3.1.2.4	Profil géométrique du lumen .....	107
3.1.2.5	Mise au point du double VFP.....	109
3.1.2.6	Bilan de l'approche de viscous finger patterning .....	113
3.2	VALIDATION BIOLOGIQUE DES VAISSEaux SUR PUCE ET RAFFINEMENT .....	114
3.2.1	<i>Intégrité de la monocouche endothéliale</i> .....	114
3.2.2	<i>Réponse en activation inflammatoire</i> .....	119
3.2.2.1	Analyse fonctionnelle de la réponse.....	119
3.2.2.2	Analyse transcriptionnelle de la réponse au TNF $\alpha$ .....	122
3.2.2.3	Application préliminaire à l'extravasation métastatique.....	123
3.2.3	<i>Réponse en perméabilité vasculaire</i> .....	126
3.2.4	<i>Enrichissement du modèle avec une multicouche cellulaire</i> .....	130
3.2.5	<i>Diversification du modèle cellulaire</i> .....	138
3.2.5.1	Etablissement d'un vaisseau sanguins pulmonaire sur puce.....	138
3.2.5.2	Etablissement de cellules endothéliales sinusoidales de foie en vaisseau sur puce .....	140
3.2.5.3	Bilan des essais de diversification.....	143
3.2.6	<i>Bilan de l'analyse des fonctions biologiques des vaisseaux sur puce</i> .....	143
3.3	VALORISATION DE NOTRE MODELE.....	144
3.3.1	<i>Effet d'un anti-miR d'intérêt sur la perméabilité vasculaire (projet interne)</i> .....	144
3.3.2	<i>Effet de la surexpression de SNAIL-1 sur la perméabilité vasculaire (équipe Anna Rita Cantelmo – EGID)</i> .....	149
3.3.3	<i>Effets de variants de l'interleukine 6 sur l'activation endothéliale et la perméabilité vasculaire (équipe Suman Mitra – CANTHER)</i> .....	150
3.3.3.1	Effets de variants de l'interleukine-6 sur une monocouche endothéliale .....	150
3.3.3.2	Influence de l'hyper IL-6 sur la réponse en activation et en perméabilité .....	151
3.3.3.3	Effets de variants de l'IL-6 sur la perméabilité vasculaire .....	154
3.3.4	<i>Effet d'inhibiteurs de tyrosine kinase sur la perméabilité vasculaire (Equipe David Tulasne – CANTHER)</i> .....	156

3.3.4.1	Thérapies ciblant les récepteurs MET.....	156
3.3.4.2	Influence de l'HGF sur la perméabilité vasculaire .....	156
3.3.5	<i>Bilan des applications explorées pour nos vaisseaux sur puce</i> .....	157
<b>CHAPITRE 4 :</b>	<b>DISCUSSION ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>159</b>
4.1	PERTINENCE BIOLOGIQUE DES VAISSEAUX SUR PUCE FABRIQUES.....	161
4.1.1	<i>Pertinence biologique d'une multicouche cellulaire</i> .....	161
4.1.2	<i>Réponse en activation des vaisseaux sur puce</i> .....	162
4.1.3	<i>Réponse en perméabilité vasculaire</i> .....	163
4.1.4	<i>Perfusion dynamique des modèles</i> .....	164
4.2	FABRICATION DES VAISSEAUX .....	165
4.2.1	<i>Parallélisation des vaisseaux sur puce</i> .....	165
4.2.2	<i>Diversification de la matrice et des modèles cellulaires</i> .....	166
<b>ANNEXES.....</b>		<b>169</b>
Annexe 1 :	<i>Curriculum vitae Elise Delannoy</i> .....	170
Annexe 2 :	<i>Article de conférence, E. Delannoy, A. Treizebre &amp; F. Soncin, «New microfluidic designs for high-throughput analysis of angiogenesis, blood vessel permeability and endothelial activation», MicroTAS proceedings, 845-6, 2020.</i> .....	173
<b>RÉFÉRENCES.....</b>		<b>175</b>



# Liste des abréviations

2D	Bidimensionnel
3D	Tridimensionnel
$\alpha$ -SMA	Actine $\alpha$ de muscle lisse, <i>alpha-Smooth Muscle Actin</i>
AH	Acide hyaluronique
ARN	Acide ribonucléique
BioMEMS	Les systèmes biomédicaux électromécaniques, <i>Biomedical MicroElectroMechanical Systems</i>
BSA	Albumine sérique bovine, <i>Bovine Serum Albumin</i>
C4F8	Octafluorocyclobutane
cDNA	ADN complémentaire, <i>complementary DNA</i>
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DRIE	<i>Deep reactive ion etching</i>
ECM	Matrice Extracellulaire, <i>Extra Cellular Matrix</i>
EGM-2	<i>Endothelial Growth Media 2</i>
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i>
HDMS	Hexamethyldisilazane
HGF	<i>Hepatocyte Growth Factor</i>
HMVEC-L	<i>Human Lung Microvascular Endothelial Cells</i>
hiPSc	cellules souches humaines pluripotentes induites, <i>human induced pluripotent stem cells</i>
HUVEC	<i>Primary human umbilical vein endothelial cells</i>
IL1- $\beta$	Interleukin-1 beta
IL-6	Interleukin-6
MEM	<i>Minimum Essential Media</i>
MET	<i>Mesenchymal Epithelial Transition</i>
NHLF	<i>Normal human lung fibroblasts</i>
PBS	Tampon phosphate salin, <i>Phosphate-Buffered Saline</i>
PCL	Poly-( $\epsilon$ - caprolactone)
PDMS	Polydimethylsiloxane
PEG	Polyéthylène Glycol
PFA	Paraformaldéhyde
PGA	Polyglycolic Acid
PLA	Polylactic Acid
PTFE	Polytetrafluoroethylene
RT-qPCR	Réaction de transcription inverse et de polymérase en chaîne quantitative, <i>Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction</i>
SF6	<i>Sulfur Hexafluoride</i>
SK-HEP-1	<i>Human Hepatic Adenocarcinoma Cell Line</i>
SU-8 DEV	<i>SU-8 developer</i>
TEER	Résistance électrique transendothéliale, <i>transendothelial electrical resistance</i>
TNF $\alpha$	<i>Tumour Necrosis Factor alpha</i>
VE cadherin	<i>vascular endothelial cadherin</i>
VFP	Modelage par digitation visqueuse, <i>Viscous finger patterning</i>
ZO-1	Zonula occludens-1



# *Chapitre 1 :*

# *Introduction*



# 1.1 ESSOR DES ORGANES SUR PUCES

---

## 1.1.1 Origine et pertinence des organes sur puce

Les Organes sur puce ou *Organ-on-chips* (OoCs) sont nés de la rencontre entre l'ingénierie tissulaire et la microfluidique. La première est un domaine interdisciplinaire qui vise à reproduire des tissus vivants et fonctionnels en combinant les approches d'ingénierie, de sciences des matériaux et de biologie cellulaire [1]. La seconde est la science des écoulements à l'échelle microscopique, typiquement de  $10^{-9}$  à  $10^{-18}$  L [2], qui permet une manipulation précise des fluides au sein de microcanaux d'une dimension typiquement inférieure au millimètre. La microfluidique a, dans un premier temps, été appliquée à la miniaturisation de systèmes analytiques, les laboratoires sur puce ou *lab-on-chips*, permettant ainsi de réduire les volumes de réactifs consommés, d'augmenter la rapidité des analyses, de contrôler plus précisément les paramètres physico-chimiques des expériences et d'améliorer leur cinétique et leur sensibilité en réduisant le volume de travail [3]. Rapidement, la possibilité de manipuler des cellules vivantes [4] et de les cultiver dans de tels environnements ont fait naître un intérêt grandissant dans la communauté scientifique. Ainsi, les premiers OoCs ont émergé [5], constituant des systèmes biomimétiques qui visent à reproduire *in vitro* le microenvironnement physiologique des tissus en 3 dimensions tout en offrant un contrôle précis des conditions de culture.

Historiquement, les techniques conventionnelles de culture cellulaire 2D *in vitro* ont permis d'étudier et de comprendre les mécanismes biophysiques et biomoléculaires fondamentaux qui régissent les cellules et les tissus. Ces approches, bien qu'elles soient largement utilisées et reconnues depuis des années [6], reflètent d'une manière très limitée les conditions physiologiques des cellules *in vivo*, notamment en raison de leur organisation 2D [7]–[9]. D'autre part, les modèles animaux ont apporté une contribution majeure à la compréhension des phénomènes physiologiques et au développement de médicaments. Cependant, ils posent des problèmes éthiques, sont très chronophages et ont un coût élevé de mise en place. Surtout, ils sont dépendants de l'espèce étudiée, rendant le transfert des résultats des études à l'homme très difficile [10], [11]. En effet, il a été estimé que seulement 8% des médicaments contre le cancer développés sur des modèles animaux étaient efficaces en essais cliniques sur les humains [12]. Les OoCs apparaissent donc comme une alternative prometteuse à ces approches en permettant d'utiliser des cellules humaines et de mimer les organes de façon physiologique en termes de structure, de fonctionnalité et de stimulation mécanique ou chimique [13].

## 1.1.2 Techniques de fabrication

Le mot « puce » dans le nom des organes sur puce émane des techniques de fabrication mise en œuvre pour les créer. En effet, celles-ci résultent d'un transfert des techniques de microfabrication développées pour la confection de composants électroniques pour les ordinateurs au domaine de la microfluidique, comme la photolithographie et la gravure chimique ou physique. La création d'une puce microfluidique et, *a fortiori*, des OoCs, repose sur la capacité à générer des structures micro- voire nanométriques et à les reproduire fidèlement. Les choix du matériau et de la méthode de fabrication ont donc une importance cruciale dans la réalisation d'un OoCs.

### 1.1.2.1 Création d'une puce microfluidique

Les premières puces microfluidiques et les premiers systèmes biologiques sur puce ont d'abord été développés sur des substrats de verre ou de silicium [14]. Rapidement ils ont été remplacés par des puces fabriquées à partir de polymères, moins chers et possédant des propriétés plus variées en termes de rigidité ou de biocompatibilité [15].

Le polydiméthylsiloxane (PDMS) est le polymère le plus largement utilisé pour fabriquer des OoCs. Il est biocompatible et transparent optiquement [16] et permet également de reproduire des structures avec une résolution nanométrique à partir d'un moule. Ce dernier est, dans la plupart des cas, fabriqué à partir d'une galette de silicium recouverte d'une résine, par exemple de la SU-8, structurée par photolithographie [17](Figure 1-1). Le moule peut également être fabriqué par micro-usinage si la résolution de la machine est suffisante pour l'échelle micrométrique. Le PDMS se formule avec deux solutions, un monomère et un agent réticulant, qui sont mélangés (typiquement avec un ratio de 10 :1) puis versé sur le moule, thermoréticulé et enfin démoulé. Après un traitement préalable au plasma oxygène pour renforcer les liaisons covalentes O-Si-O en surface [18], le PDMS est finalement scellé sur un substrat de PDMS ou de verre pour fermer les canaux, puis recuit pour renforcer ce collage. Malgré sa grande popularité due à sa simplicité de formulation, sa stabilité et sa relative inertie chimique, le PDMS possède l'inconvénient d'être hydrophobe, il est donc difficile pour des cellules de s'y établir sans fonctionnalisation ou revêtement de sa surface [19]. Il est également perméable aux gaz, ce qui peut provoquer l'apparition de bulles d'air, fatales pour les cellules si l'environnement n'est pas assez humide [19]. De plus, il a l'inconvénient d'absorber facilement les molécules hydrophobes à sa surface, ce qui peut causer la rétention indésirable de facteurs solubles nécessaires à la croissance des cellules ou celle des traitements injectés dans les OoCs.

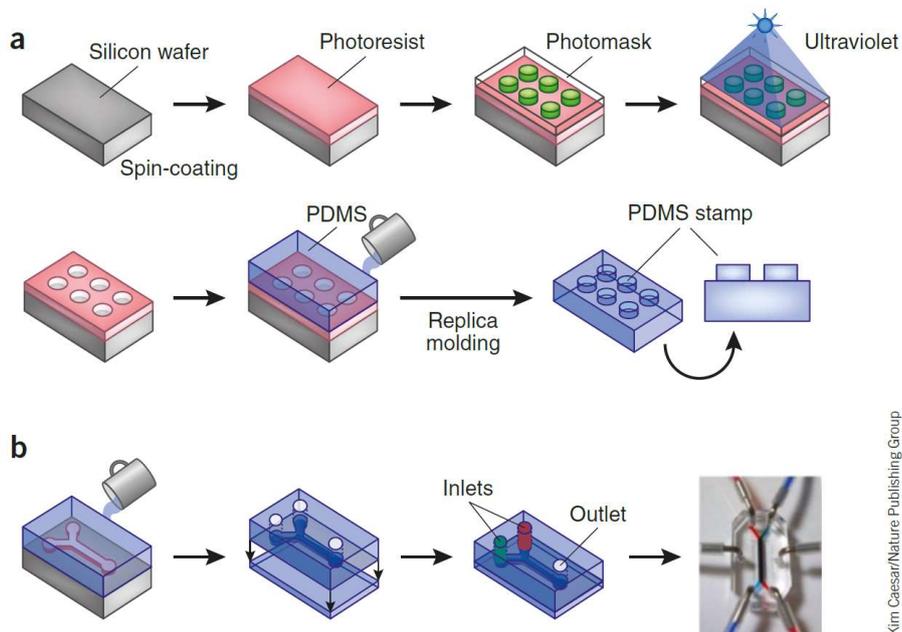


Figure 1-1 Processus de fabrication d'un moule par photolithographie (a) et d'une puce microfluidique en PDMS (b), adapté de [20]

D'autres matériaux sont de plus en plus utilisés, comme les thermoplastiques tels que le poly(méthyl méthacrylate) (PMMA), le polycarbonate (PC) ou le polystyrène (PS). Ils peuvent servir à fabriquer des puces microfluidiques en prototypage rapide grâce aux techniques de micro-usinage et

de découpe laser. Celles-ci sont peu onéreuses mais ne garantissent toutefois qu'une assez faible résolution d'une centaine de micromètres [21]. Pour une production à plus large échelle, les techniques de gaufrage thermique ou de moulage par injection sont privilégiées [21]. Les thermoplastiques sont largement éprouvés dans les laboratoires de biologie et bénéficient donc d'une bonne réputation auprès des chercheurs. Cependant, un réel désavantage lié à leur utilisation est la difficulté de sceller entre elles avec une bonne étanchéité les différentes parties des puces microfluidiques après leur fabrication [19].

Il n'existe pas aujourd'hui de consensus quant au choix du matériau de fabrication des OoCs. On note une préférence pour le PDMS du côté des laboratoires en raison de sa facilité de mise en œuvre. Cependant les thermoplastiques semblent beaucoup plus indiqués dans un objectif de commercialisation et d'utilisation à large échelle. Pour ce travail, notre choix s'est porté sur le PDMS pour sa versatilité et sa facilité de mise en œuvre. En ce qui concerne les moules, ils ont été réalisés par microfabrication pour les premiers essais, puis par micro-usinage pour créer des moules comportant plus de dispositifs afin d'augmenter la cadence de production des puces microfluidiques une fois le format définitif choisi.

#### 1.1.2.2 *Choix de la matrice extracellulaire*

Bien que les polymères cités précédemment offrent une structure de base pour les OoCs et cloisonnent efficacement le futur microenvironnement des cellules, ils sont loin de refléter les propriétés de la matrice extracellulaire (*Extra Cellular Matrix* - ECM) sur lesquelles reposent les cellules *in vivo* [22]. Pour cette raison, une grande majorité des OoCs sont complétés avec des biomatériaux naturels ou synthétiques. Ceux-ci sont choisis en fonction de leur biocompatibilité, de leurs propriétés mécaniques, de leur dégradabilité ou encore de leur porosité, tout cela selon l'organe à reproduire [23], [24].

Parmi les biomatériaux naturels les plus utilisés dans les OoCs, on trouve le Matrigel. Celui-ci est particulièrement apprécié en ingénierie tissulaire car il comporte de nombreuses protéines présentes naturellement dans l'ECM, comme la laminine ou le collagène de type IV [25] et il permet donc une bonne adhérence cellulaire. Sa forme proche d'un gel lui permet, de plus, d'être injectable au sein des puces microfluidiques [26]. Cependant, il est extrait de tumeurs propagées chez la souris, ce qui, en plus d'être éthiquement problématique, pose des problèmes de variabilité de composition inter lots qui peut mettre en péril la reproductibilité des expériences. Notamment, ces différences affectent les propriétés mécaniques et le contenu en facteurs biologiques de ce matériau. Pour fabriquer des OoCs avec des résultats plus reproductibles, d'autres matériaux mimant l'ECM ont été explorés.

Le collagène est un composant matriciel et substrat d'adhérence naturel majeur qui est, lui aussi, largement utilisé dans les OoCs. Sa structure fibrillaire offre des propriétés mécaniques satisfaisantes et sa porosité garantit une bonne diffusion du milieu de culture [27]. Il est extrait de différentes sources animales comme le rat, le porc, le bœuf ou le poisson et peut être injecté sous forme liquide dans les puces microfluidiques, puis être thermiquement réticulé à température ambiante ou dans un incubateur. Son principal défaut est d'être instable dans la durée en l'absence de soutien mécanique à cause de son remodelage par les cellules. Pour remédier à cela, le collagène peut être additionné d'agents réticulants afin d'augmenter sa rigidité. Sous sa forme gel, il a été utilisé dans de nombreux OoCs, notamment de cœur [28], de foie [29], de vaisseaux [30], de reins [31] ou de cerveau [32]. La

gélatine, un dérivé du collagène est également très populaire, notamment sous sa forme méthacrylate GelMA, rendant sa rigidité modulable par une exposition aux UV [33].

Enfin, d'autres biomatériaux naturels comme la fibrine, l'alginate ou le chitosan sont utilisés dans les OoCs et permettent de former des hydrogels en contrôlant respectivement une activité enzymatique, la concentration calcique ou la température et le pH mais il est parfois nécessaire de les associer à d'autres polymères pour compenser leur faible résistance mécanique[34]. Les matériaux évoqués ci-dessus sont récapitulés dans le Tableau 1-1.

Tableau 1-1 Biomatériaux naturels utilisés dans les OoCs et leur méthode de gélification.

Biomatériau naturel	Méthode de gélification
Matrigel	Température
Collagène	Température, pH, concentration
Gélatine	Température, concentration
GelMA	Agent réticulant et Photopolymérisation
Fibrine	Réaction enzymatique (thrombine)
Alginate	Concentration de Calcium
Chitosan	pH, température, réaction chimique

Des biomatériaux synthétiques ont été développés afin de contourner les inconvénients des biomatériaux naturels, comme la variabilité inter lots ou les difficultés de purification et de stérilisation. Leur caractère synthétique permet un contrôle beaucoup plus précis de leurs propriétés physico-chimiques et de leur fonctionnalisation. Ils permettent également une meilleure reproductibilité des résultats. Ceux-ci sont récapitulés dans le Tableau 1-2.

Tableau 1-2 Biomatériaux synthétiques utilisés dans les OoCs, adapté de [24].

Biomatériau synthétique	Avantages	Applications aux organes sur puce
Poly-(ε- caprolactone)- PCL	Peu coûteux	Vaisseaux Cœur
	Compatible avec de nombreuses techniques de fabrication	
PDMS	Bonnes propriétés mécaniques	Poumon Rein Cerveau
	Biocompatible	
	Transparent	
Polyéthylène Glycol - PEG	Grande flexibilité, adéquat pour des étirements cycliques	Pancréas Os
	Biodégradable	
	Hydrophile	
Polylactic Acid - PLA	Propriétés mécaniques modulables	Vaisseaux
	Biodégradable	
Polyglycolic Acid – PGA	Propriétés mécaniques modulables	Reins
	Biodégradable	
Poly(lactide-coglycolide) - PLGA	Biocompatible	Poumons Cerveau Vaisseaux Os
	Biodégradable	
	Porosité élevée	

	Haute résistance mécanique	
Polyuréthane - PU	Hydrophile	
	Biocompatible	
	Biodégradable	
	Compatible avec de nombreuses techniques de fabrication.	
		Poumons

Dans le cadre de ce travail, nous avons utilisé principalement le collagène de type I dans nos puces microfluidiques. Nous avons également testé Biomimesys, une matrice commerciale synthétique à base d'acide hyaluronique.

### 1.1.2.3 Architecture des hydrogels au sein des OoCs

Les biomatériaux présentés précédemment, permettent, grâce à leurs propriétés mécaniques, de recréer de multiples architectures au sein des OoCs. Dans la plupart des systèmes, ils sont présents sous forme d'hydrogel et d'échafaudage (ou *scaffold*) de fibres et sont structurés par différentes techniques. Une approche très populaire et qui ne demande pas d'instrumentation supplémentaire est la conformation des hydrogels dans un canal via des micro-plots, en profitant de la tension de surface des solutions d'hydrogel pour les confiner dans un canal microfluidique ouvert sur ses voisins (Figure 1-2). La résolution de cette approche est la même que celle atteinte lors de la réalisation de la puce microfluidique elle-même, typiquement de l'ordre du micromètre [35].

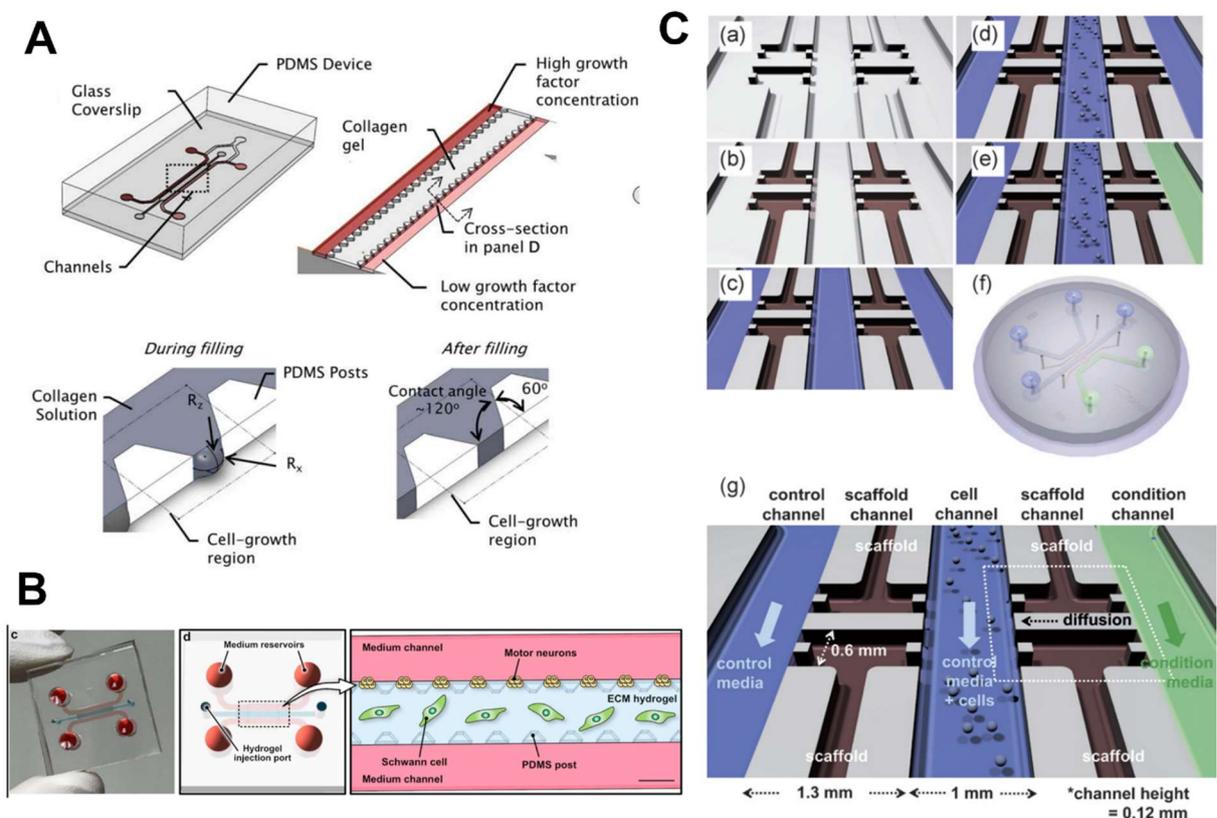


Figure 1-2 Technique de structuration d'hydrogel par micro-plots. A) et B) Exemples de puces à micro-plots. C) Etapes de remplissage d'une puce à micro-plots avec un hydrogel, adapté de [36] (A), [37](B), [38]

Des techniques optiques permettent également de créer une structure 3D à partir d'un hydrogel. L'ablation laser, une approche soustractive, consiste à détruire localement un hydrogel et ainsi y créer des structures creuses avec une résolution d'environ  $1\mu\text{m}$  [35] (Figure 1-3 A). Elle a notamment été utilisée pour guider la croissance de projections neuronales [39] ou pour recréer la ramification vasculaire [40]. La stéréolithographie est, à l'inverse, une approche additive qui permet de photopolymériser couche par couche un hydrogel photosensible avec une résolution de  $1\mu\text{m}$  [35] (Figure 1-3 E). Elle a été, par exemple, mise en œuvre pour construire un réseau épithélial de foie [41].

Les techniques d'extrusion sont de plus en plus associées à la fabrication d'OoCs. L'électrofilage permet de créer une architecture poreuse en empilant des fibres de polymère extrudé sous haute tension (Figure 1-3). Le diamètre des fibres générées est de l'ordre du nanomètre au micromètre, selon les paramètres choisis [42]. La matrice ainsi produite possède un ratio surface/volume très élevé. Cette technique a notamment été utilisée pour développer une membrane sur laquelle sont cultivées les cellules dans un OoCs de poumons [43]. Cette technique n'est cependant compatible qu'avec certains polymères synthétiques, comme les PCL et les PLA et avec des hydrogels naturels comme le collagène. Pour cela, ils doivent être rendus liquides *via* un solvant dont la cytotoxicité peut être problématique [44]. En revanche, les approches d'impression biologique, inspirées des méthodes d'impression 3D classiques, sont quant à elles compatibles avec les polymères sous forme d'hydrogel. Une structure 3D peut ainsi être construite avec une résolution d'environ  $10\mu\text{m}$  [35] en déposant le matériau couche après couche. Les hydrogels servant à l'impression peuvent également servir de matériau sacrificiel ou êtreensemencés de cellules en amont de l'impression (Figure 1-3 B). Ces approches sont très intéressantes car elles permettent de reproduire une variété de structures 3D, pourtant leur intégration aux OoCs est difficile puisque qu'il est nécessaire de bénéficier d'un système ouvert pour réaliser l'impression 3D. Elles ont été utilisées pour créer des structures vasculaires [45], cardiaques [46] et hépatiques [47], par exemple.

Enfin, la génération de fibres de polymère par co-courant concentriques ou *co-flow* est une approche fluïdique très prometteuse. Elle repose sur la mise en flux de manière coaxiale d'un ou plusieurs polymères avec une solution contenant un agent de gélification, formant ainsi une fibre d'hydrogel avec une résolution d'environ  $10\mu\text{m}$  [35]. Les cellules peuvent même être directement intégrées au polymère en amont de la formation de la fibre. L'alginate, qui forme un gel en présence de calcium, est particulièrement appréciée pour ce genre d'approche et permet de produire des fibres de plusieurs dizaines de centimètres de long [48]. Cette technique ne permet de générer qu'une géométrie de fibre linéaire mais il est toutefois possible de les empiler et de les agencer entre elles de manière à créer une réelle architecture 3D (Figure 1-3 D).

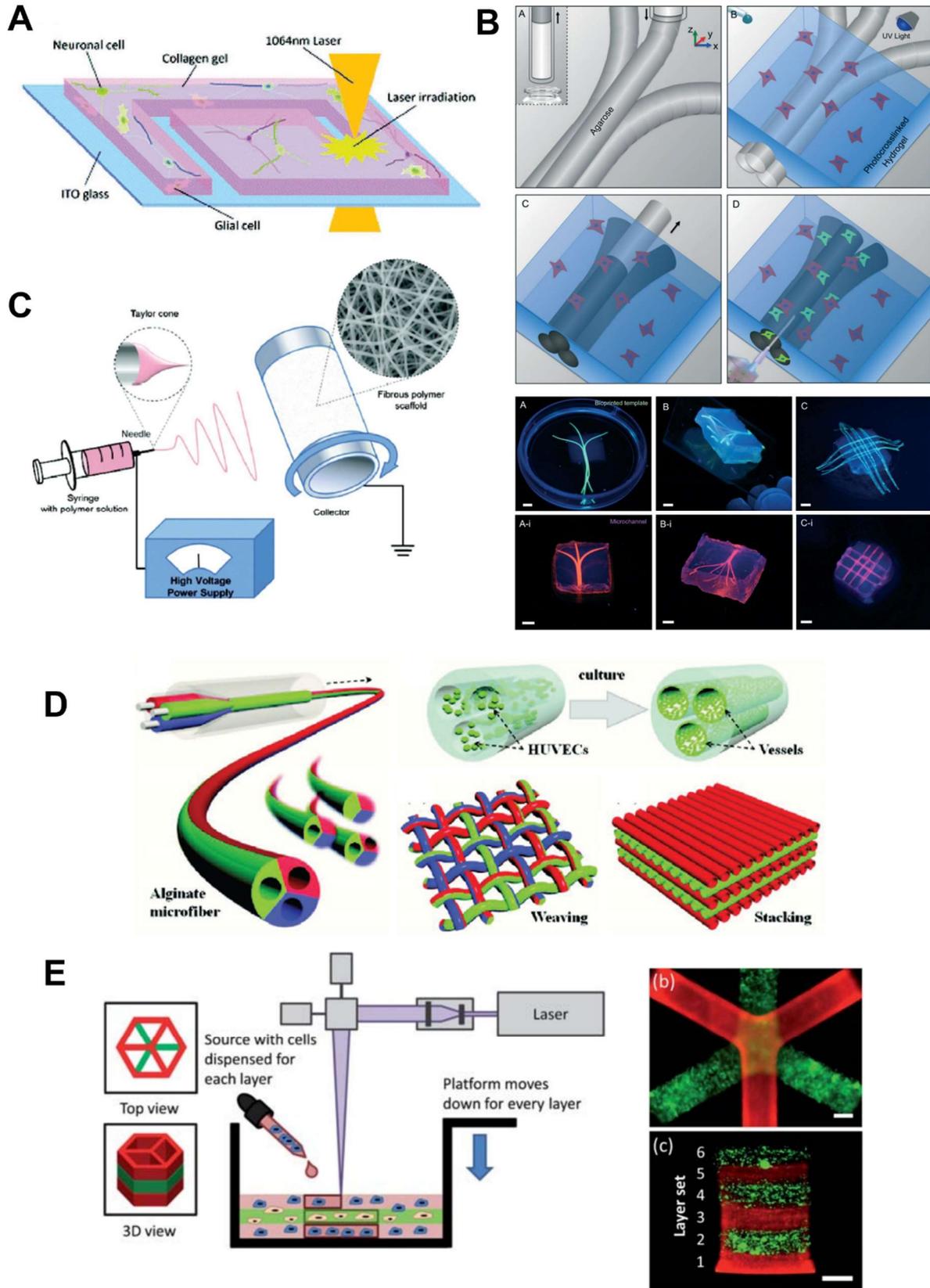


Figure 1-3 Techniques de structuration des biomatériaux. A) Ablation laser, adaptée de [23]. B) Bio-impression 3D, adaptée de [45]. C) Electro filage, adaptée de [23]. D) *Co-flow* de fibre d'alginate, adapté de [23]. E) Stéréolithographie, adaptée de [49].

### 1.1.3 Principales caractéristiques des organes sur puces

Afin de reproduire un microenvironnement physiologiquement pertinent, les OoCs s'appuient sur différentes composantes, dont le choix de la source cellulaire, l'organisation tridimensionnelle des cellules, le contrôle dynamique du flux au sein de la puce microfluidique et l'établissement de gradients de molécules biochimiques. Ces choix sont guidés dès la conception d'OoCs par la situation physiologique que l'on tente de recréer.

#### 1.1.3.1 Sources cellulaires

Le choix de la source cellulaire est primordial pour obtenir un modèle pertinent. En effet, chaque source présente des avantages et des inconvénients, *Low et al.* ironisent même en citant l'aphorisme du statisticien George Box « *Tous les modèles sont faux mais certains sont utiles* » [13], illustrant bien que c'est la question biologique à laquelle on souhaite répondre qui doit guider le choix de la source cellulaire. Les cellules humaines utilisées dans les OoCs sont des cellules de lignées immortalisées, des cellules primaires ou des cellules souches.

Les lignées immortalisées ont l'avantage de provenir de sources historiques généralement fiables et d'être faciles à cultiver, avec un taux de prolifération qui permet d'obtenir un nombre important de cellules et donc, une bonne densité d'ensemencement dans les OoCs. Elles fournissent des réponses stables avec une bonne reproductibilité. Cependant, leur immortalisation et les nombreuses divisions et sous passages que ces cellules ont connues conduisent à une dérive génétique et phénotypique [50] et ces cellules n'ont généralement pas conservé leur différenciation tissulaire d'origine. Elles posent donc des problèmes de fiabilité des modèles [51], [52].

D'un autre côté, les cellules primaires sont très proches des cellules *in vivo* puisqu'elles sont directement isolées du tissu vivant, sans modification génétique et sont utilisées uniquement lors de leurs premières divisions en culture *in vitro* [51]. Elles sont très populaires dans la communauté des OoCs et ont été utilisées pour reproduire de nombreux organes comme le foie [53]–[55], les vaisseaux sanguins [30], [56]–[58], les poumons [59]–[61], le cerveau [32], [62], [63] ou les reins [64], [65]. Il existe cependant une variabilité interdonneur qui peut poser des problèmes de reproductibilité des expériences mais qui peut aussi s'avérer être un avantage s'il on souhaite refléter la variabilité au sein d'une population. Les cellules primaires sont généralement plus difficiles à maintenir en culture *in vitro*, d'une part à cause de leur durée de vie limitée (nombres de divisions) et parce qu'elles perdent rapidement leur phénotype d'origine si le milieu et les conditions de culture ne sont pas optimales [66].

Les cellules souches humaines pluripotentes induites ou *human induced pluripotent stem cells* (hiPSc) représentent une source de cellules intéressante pour les OoCs. En effet, elles sont dérivées de tissus adultes, sont reprogrammées *in vitro* et représentent théoriquement une source infinie de cellules issues d'un même donneur. Dans leur état dédifférencié, elles peuvent être maintenues en culture et se multiplier « indéfiniment » et, surtout, elles peuvent être redifférenciées en de nombreux autres types cellulaires avec les stimulations adéquates [67]. Elles ont notamment été appliquées pour reproduire des OoCs de cœur [46], [68], de foie [69] ou de cerveau [70]. De plus, les hiPSc donnent la possibilité originale de créer des OoCs à partir des cellules de patients et ouvrent donc une voie vers la médecine personnalisée. Cependant les processus de reprogrammation et de différenciation des hiPSc sont très longs et coûteux par rapport à l'achat de cellules commerciales et leur

reprogrammation peut poser question quant à leur possible dérive au long terme, notamment cancéreuse, une fois réimplantées chez les patients.

Enfin, un effort a récemment été fourni dans l'optique d'intégrer des cellules de patients provenant de biopsies dans les OoCs [71]. Les approches consistent soit à maintenir en culture le tissu complet issu de la biopsie [72], [73], soit à isoler les types cellulaires souhaités à partir des tissus extraits du patient. Un exemple de poumons sur puce a notamment été développé de cette manière à partir de cellules d'un patient atteint de bronchopneumopathie chronique obstructive [61].

Dans le cadre de ce travail nous avons utilisé essentiellement des cellules primaires humaines et occasionnellement des lignées établies.

### 1.1.3.2 Disposition 3D des cellules

Une fois la ou les sources cellulaires choisies, les OoCs offrent une myriade de possibilités quant au choix de leur agencement en trois dimensions dans les puces, sachant que la structuration 3D influe fortement sur le comportement des cellules et leur fonctionnalité [74]. La disposition des cellules est donc choisie en fonction du phénomène ou de la fonction biologique à reproduire et à observer et de l'analyse souhaitée.

Une méthode simple pour disposer les cellules dans les OoCs est de les laisser s'auto-assembler au sein d'un hydrogel. Celui-ci fournit un support matriciel solide et biocompatible pour permettre leur établissement en 3D [75]. Cependant, en procédant ainsi, il n'est pas possible de contrôler la structure finale obtenue, ce qui peut introduire une variabilité entre les expériences.

Pour les applications où il est nécessaire de contraindre spatialement les cellules plus précisément, il est possible de fonctionnaliser les surfaces choisies à l'intérieur des OoCs. Cela permet notamment de promouvoir l'adhérence des cellules ou, au contraire, de l'empêcher dans certaines zones, résultant en un motif cellulaire prédéfini au sein de la puce [76], [77]. Il est aussi possible de structurer la puce microfluidique en amont pour qu'elle reproduise la configuration 3D souhaitée. Par exemple, avec des canaux placés en parallèle et séparés par des micro-plots [78] ou une membrane poreuse [5], [79]. Enfin, beaucoup de modèles d'OoCs reposent sur le modelage initial d'un hydrogel au sein des puces pour mimer la structuration 3D tissulaire suivi de l'ensemencement des cellules [32], [80] (Figure 1-4).

La dimension 3D est également recréée au sein des OoCs par l'apposition de différents types cellulaires et leur structuration en multicouches [58], [81]. Ces multicouches amènent une complexité supplémentaire s'approchant davantage de la configuration *in vivo* (Figure 1-4). Elles sont cependant complexes à établir et à maintenir car les paramètres permettant la coculture optimale de tous les types cellulaires au sein d'une même puce peuvent être difficiles à mettre au point.

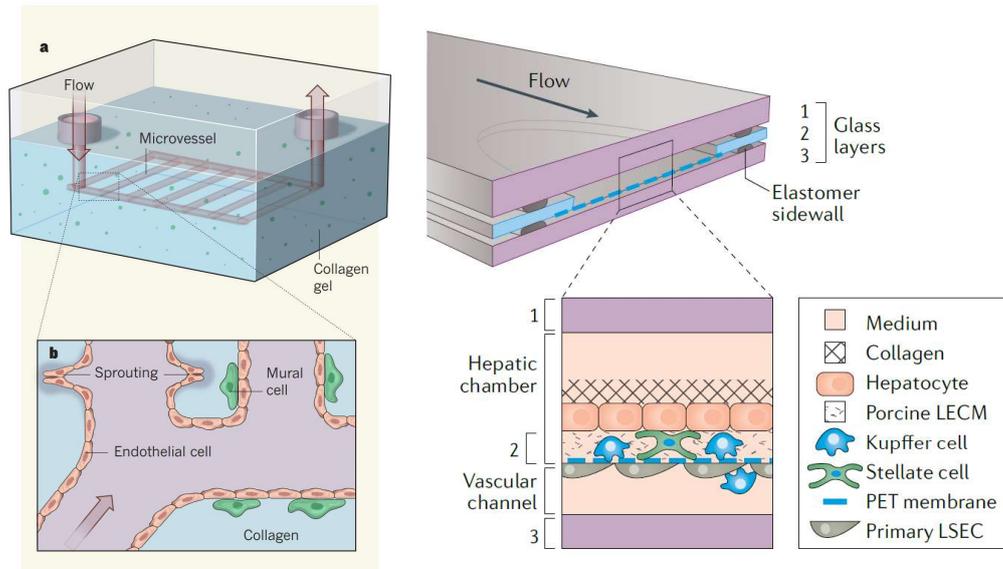


Figure 1-4 Exemples de structuration 3D des cellules dans des OoCs contenant des hydrogels prémodelés (a et b) ou sous la forme d'une multicouche cellulaire (b et c). a et b adapté de [82] et c adapté de [13].

Dans ce travail, des approches de modelage préalable des hydrogels et des cultures multicellulaires ont été élaborées pour créer des OoCs vasculaires.

### 1.1.3.3 Perfusion en flux laminaire

La versatilité de la conception d'OoCs ne se limite pas à leur modularité en termes de structure. En effet, la configuration microfluidique offre l'avantage conséquent de permettre la mise en perfusion des systèmes et le contrôle fin des paramètres de flux.

D'une part, la circulation et l'échange de milieu de culture peuvent être optimisés et automatisés, conférant un apport continu de nutriments et d'oxygène aux cellules [83] et une évacuation des débris cellulaires plus efficace [13], mimant ainsi des fonctions essentielles de la circulation sanguine. L'automatisation de la perfusion permet également d'éviter les variations de composition du milieu (appauvrissement, acidification) entre deux renouvellements, en comparaison avec la culture statique et permet, accessoirement, de libérer l'expérimentateur des contraintes liées à l'entretien des cellules.

D'autre part, les forces de cisaillement induites par le flux au sein de microcanaux favorisent la fonctionnalité des organes, comme observé dans des contextes rénaux et pulmonaires [84], [85] et orientent également la morphologie des cellules [86]. Ces forces de cisaillement peuvent également être impliquées dans la différenciation des cellulesensemencées dans les dispositifs microfluidiques [87].

Enfin, grâce aux dimensions des canaux des puces microfluidiques et donc, de la prépondérance des forces visqueuses sur les forces inertielles au sein de celles-ci, les écoulements dans les microcanaux sont laminaires [88]. Cette particularité permet notamment de créer des gradients physiques (température, pression) ou biochimiques dans les OoCs, mimant des conditions particulières *in vivo*. De tels gradients ont notamment été utilisés pour étudier la migration de cellules [89]–[91] (Figure 1-5), l'angiogenèse [92], [93] ou encore la ramification axonale [94].

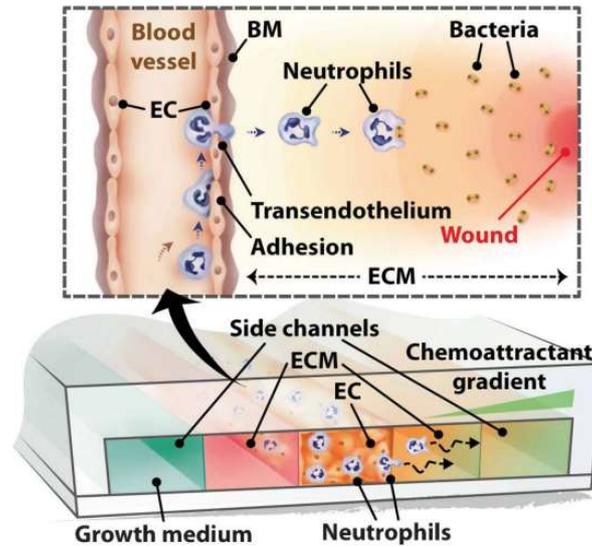


Figure 1-5 Schéma d'un dispositif microfluidique d'OoCs reproduisant la migration transendothéliale de cellules de l'immunité induite par chimiotaxie, adapté de [91]

#### 1.1.3.4 Un microenvironnement dynamique et sensible

En plus des avantages apportés par la perfusion microfluidiques, les microtechnologies appliquées aux OoCs permettent de recréer un environnement dynamique et sensible. Les systèmes biomédicaux électromécaniques (*Biomedical MicroElectroMechanical Systems* - BioMEMS) intègrent des micro-actuateurs et des micro-capteurs au sein de dispositifs pour des applications biologiques. Les approches développées au sein de ceux-ci peuvent être transférées aux OoCs et offrir ainsi un contrôle dynamique sur les stimulations mécaniques et électriques. La possibilité d'intégrer des capteurs au sein des OoCs est également très intéressante pour la réalisation d'analyses *in situ*.

D'une part, les cellules subissent *in vivo* de nombreuses stimulations mécaniques. L'élasticité et la rigidité de l'ECM jouent un rôle majeur dans la prolifération, la différenciation, la migration, et la maturation des cellules [95]. Cependant, cette rigidité ne reproduit pas à elle seule l'ensemble des contraintes imposées aux tissus. La respiration ou le battement cardiaque, par exemple, génèrent des déformations importantes des tissus. Pour les reproduire, des approches d'étirements cycliques ont été développées dans des OoCs de cœur [96] et de poumon [5]. D'autre part, le développement et la fonctionnalité de certains tissus, comme les muscles ou les neurones, sont orientés par des stimulations électriques [97]. L'incorporation d'électrodes a donc notamment été réalisée pour des OoCs de cœur [98] et de neurones [99].

L'intégration de capteurs permet le suivi en temps réel des paramètres du microenvironnement et des réponses des cellules. Tout d'abord, les capteurs optiques sont facilement miniaturisés et adaptés aux OoCs pour détecter, par exemple, les variations de pH et de concentration de glucose par absorbance ou fluorescence [100]. Ensuite, des capteurs électrochimiques permettent de mesurer la concentration de molécules pour suivre, par exemple, la sécrétion de biomarqueurs [101] (Figure 1-6 C). Enfin, les capteurs électriques sont les plus largement répandus, leurs applications concernant notamment des mesures de perméabilité de couches cellulaires [79] (Figure 1-6 A) et le suivi de croissance et l'activité des cellules [102] (Figure 1-6). L'ensemble de ces capteurs est utilisé soit dans

l'objectif d'optimiser et de monitorer les conditions de culture sur le long terme, soit pour réaliser des mesures précises des réponses tissulaires, en fonction des conditions d'expérience.

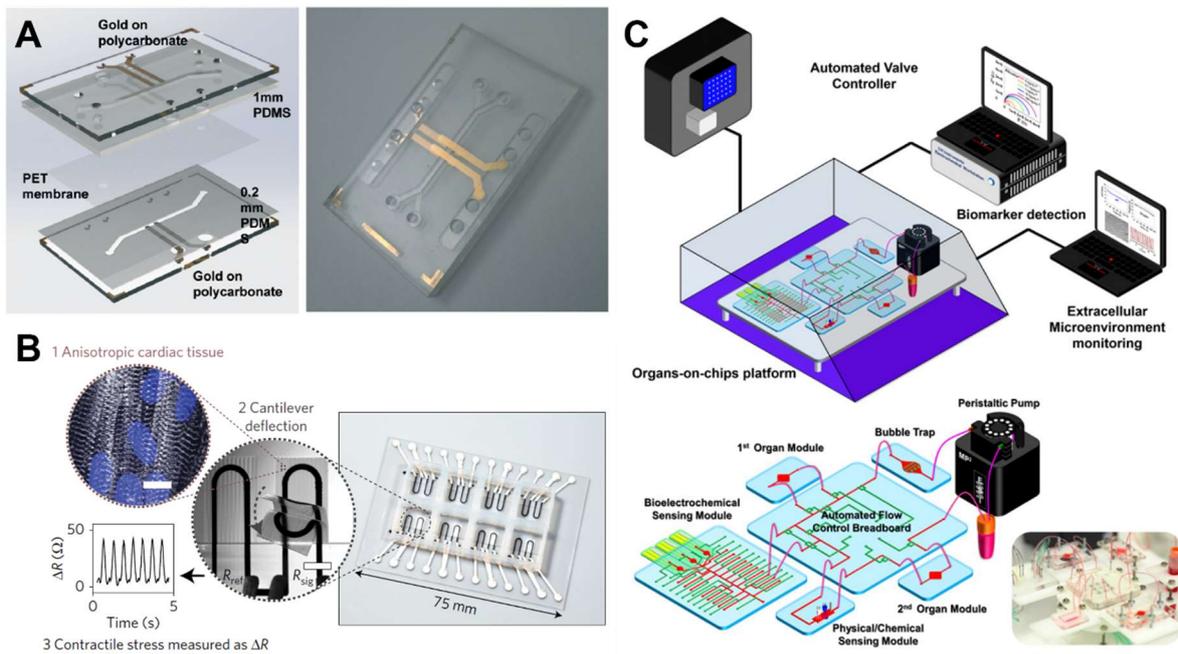


Figure 1-6 Exemples de capteurs intégrés aux OoCs. A) Capteur électrique de perméabilité, adapté de [103]. B) Capteur d'activité contractile de cellules cardiaques, adapté de [46]. C) Plateforme multi-capteurs pour les OoCs, adapté de [101].

### 1.1.4 Reproduire les fonctions des organes

L'ensemble des approches décrites précédemment fournit des outils performants dans le but de mimer le contexte physiologique d'un organe et de le reproduire au sein d'OoCs. Grâce à ces clés technologiques, les fonctions de différents organes ont pu être reproduites (Figure 1-7), telles que récapitulées dans le Tableau 1-3.

Tableau 1-3 Bilan des organes reproduit dans des OoCs et des fonctionnalités étudiées.

Organes	Fonctions reproduites	Modèles
Poumons	Interface alvéoles/capillaires et inflammation	[5]
	Perméabilité de la couche épithéliale sous stimulation mécanique	[104]
Rein	Filtration glomérulaire	[105]
Cerveau	Perméabilité de la barrière hématoencéphalique	[32], [62], [63], [70], [79]
Cœur	Contractilité	[96]
	Hypoxie lors d'un infarctus	[106]
Foie	Détoxification du sang	[55]
Intestin	Inflammation	[107]
Peau	CÉdème et inflammation	[108]

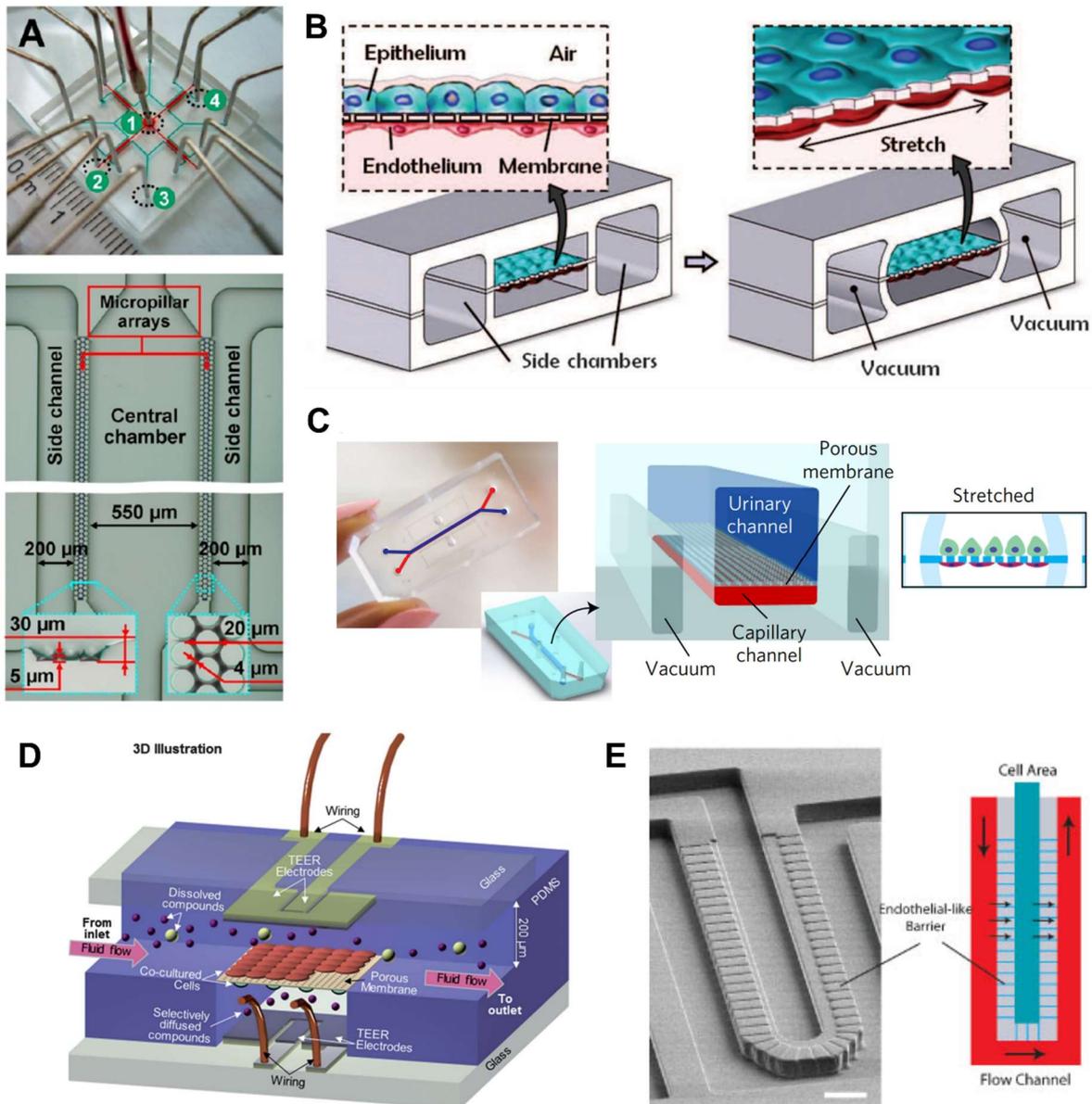


Figure 1-7 Exemple d'OoCs développés pour différents organes. A) Cœur sur puce reproduisant la blessure provoqué par un infarctus, adapté de [106]. B) Poumon sur puce avec une membrane déformable pour mimer la respiration, adapté de [5]. C) Rein sur puce pour recréer la filtration glomérulaire, adapté de [105]. D) Modèle de barrière hématoencéphalique sur puce, adapté de [79]. E) Foie sur puce reproduisant le processus de détoxification du sang, adapté de [55]

### 1.1.5 Vers un humain sur puce

Les OoCs sont donc des systèmes permettant de mimer des situations biologiques très fines et reproduisant des phénomènes très locaux. Toutefois, ils ont également le potentiel de reproduire des dynamiques plus globales, à l'échelle d'un organe et également à l'échelle de l'humain, si l'on est capable de les relier entre eux et ainsi d'observer leurs interactions. Le développement de multi-organes sur puces, voire d'un humain sur puce, sont des perspectives attrayantes pour le criblage de médicaments et l'évaluation de leur toxicité, par exemple (Figure 1-8).

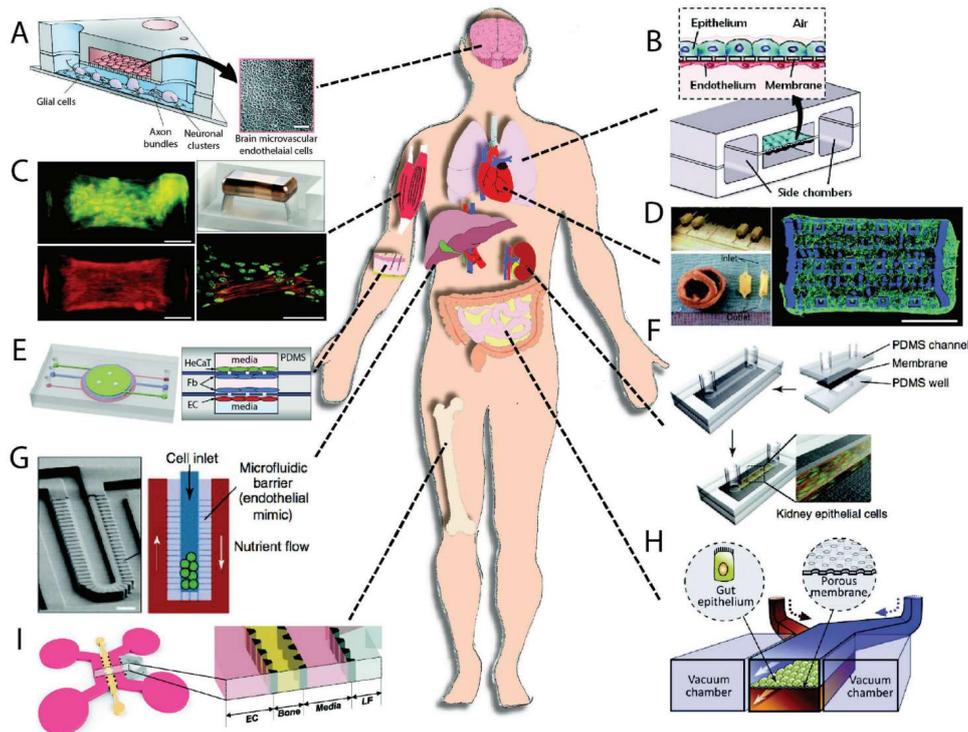


Figure 1-8 Différents modèles d'OoCs et les organes correspondants dans le corps humain. Adapté de [23]

Comme évoqué précédemment, chaque OoCs est développé avec des caractéristiques bien précises pour correspondre à la physiologie spécifique de l'organe qu'il cherche à reproduire. Connecter des OoCs tout en maintenant des conditions idéales pour chacun d'entre eux peut s'avérer toutefois particulièrement complexe. Le choix du milieu de culture ainsi que son schéma de circulation sont cruciaux pour le fonctionnement d'un tel ensemble. Il est possible de mélanger les milieux de culture des organes reliés comme dans le cas d'un modèle de reins-foie [109], mais plus on ajoute « d'organes », plus on risque de fournir un milieu inadapté à chacun des organes mimés et donc de s'éloigner de conditions physiologiques optimales. Les systèmes de circulation de milieu développés sont soit en boucle ouverte avec une entrée et une sortie [75], soit en recirculation avec une boucle fermée [110, p.]. La première option ne permet ainsi qu'une signalisation croisée avec les OoCs situés en aval du système alors que la seconde permet à tous les organes de « communiquer » entre eux qu'ils soient placés en amont ou en aval du système. D'autre part, plutôt que de connecter les organes en série, il est possible de créer des boucles de circulation de milieu pour chaque organe et de relier celles-ci *via* une boucle vasculaire unique qui agit en tant que barrière sélective (Figure 1-9 B et C), permettant ainsi de garder un milieu spécifique pour chaque OoCs tout en les connectant entre eux [111]–[113]. Le maintien et la validation biologique de telles plateformes sont toutefois loin d'être aisés, leur complexité entravant leur application commerciale et à plus large échelle.

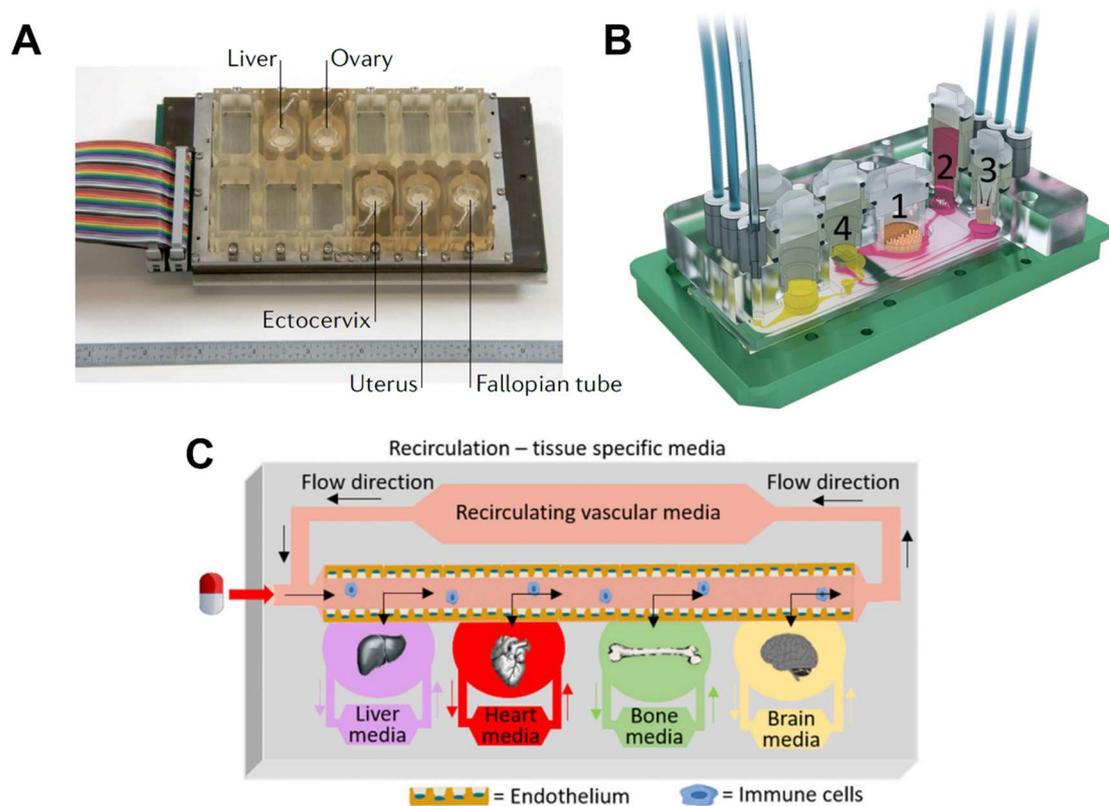


Figure 1-9 Intégration de multi-OoCs pour la construction d'un humain sur puce. A) Plateforme multi-OoCs reproduisant le système reproducteur féminin, adapté de [114]. B) Plateforme pour la culture simultanée d'OoCs de foie, de reins, de peau et d'intestins, adapté de [112]. C) Schéma de principe de recirculations principale et secondaires dans une plateforme multi-OoCs [115].

Le choix des organes intégrés dans ces plateformes multi-OoCs est également très important en fonction de la question biologique adressée. Le foie et les reins sont des organes cruciaux pour la métabolisation des molécules et leur évacuation [23], il est donc essentiel de les intégrer dans les plateformes utilisées pour le criblage de médicaments [116]. Les intestins ont eux aussi un rôle déterminant pour l'absorption des médicaments administrés oralement, des plateformes de foie-intestin ont été fabriquées dans cette optique [117]. Enfin, les vaisseaux sanguins forment une barrière sélective au passage des molécules, notamment au niveau la barrière hématoencéphalique, il est donc primordial de les intégrer aux plateformes de multi-OoCs [118].

Un aspect important à considérer pour la fabrication de plateformes multi-OoCs est le choix de l'échelle entre les différents organes à reproduire. Celle-ci peut être choisie de manière allométrique, c'est-à-dire selon le ratio de masse réelle entre les organes du corps humain ou selon leur activité métabolique par exemple [119]. Il est d'ailleurs indispensable de prendre en compte ce paramètre si l'on veut extrapoler les résultats obtenus *in vitro* à *in vivo* et, notamment, déterminer les paramètres d'Absorption, de Distribution, de Métabolisation et d'Élimination (paramètres ADME) de médicaments.

Enfin, le développement de ce type de plateformes combiné à l'utilisation d'hiPSc pourrait mener à la création de « patient sur puce ». Il serait alors possible de trouver et d'optimiser des thérapies pour les patients souffrant d'une maladie rare ou d'un cancer ne répondant pas aux traitements classiques [13].

### 1.1.6 Enjeux de la vascularisation et de l'étude des vaisseaux

Dans le cadre des OoCs, il est essentiel de reproduire une des fonctions principales du réseau vasculaire qui est d'éviter la mort des tissus en les perfusant de métabolites essentiels et d'oxygène. De plus, la plupart des organes sont hautement vascularisés, comme le foie, les reins, le cœur et le cerveau. La vascularisation des OoCs devraient également reproduire fidèlement la physiologie des organes et leur endothélium spécifique. De nombreux OoCs recréent cette intrication des vaisseaux sanguins au sein des tissus des organes, comme des OoCs de foie [29], de poumons [5] et de reins [105]. D'autre part, les OoCs vasculaires visent à recréer ce canal de communication principal entre les organes qui est essentiel pour construire des plateformes multi-OoCs.

Les vaisseaux sanguins sont des tissus biologiques à part entière, avec des fonctionnalités et une physiologie spécifique. Pour les étudier, des OoCs vasculaires, les vaisseaux sur puce, sont développés. Le cœur de ce travail a été la conception et la mise en œuvre de tels vaisseaux sur puce.

## 1.2 REPRODUIRE DES TUBES ENDOTHELIALISES

---

D'un point de vue purement morphologique, le réseau vasculaire peut être vu comme un ensemble de tubes interconnectés, de sections plus ou moins larges, où le sang circule en boucle (Figure 1-10). La première étape, si l'on veut fabriquer des vaisseaux sur puce, est donc de reproduire ces structures tubulaires, au moins en partie, et de mimer l'interface avec le sang, d'une part, et avec la matrice extracellulaire, d'autre part. La seconde étape sera de se servir de la théorie des écoulements microfluidiques pour reproduire un flux sanguin physiologique.

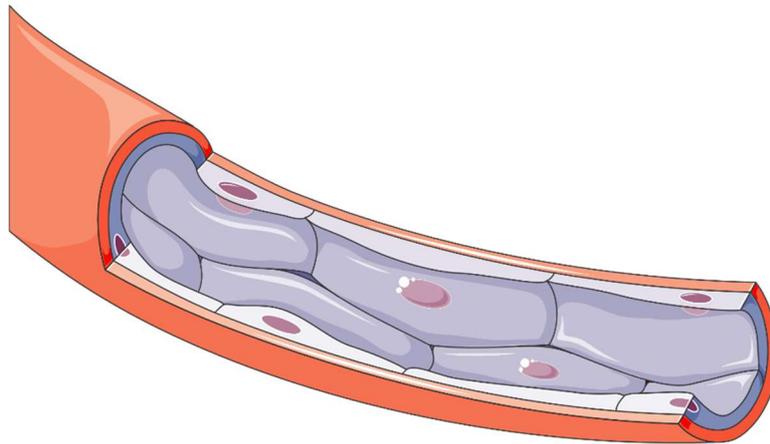


Figure 1-10 Représentation schématique d'un vaisseau sanguin en coupe longitudinale partielle

### 1.2.1 Méthodes de fabrication des vaisseaux

De nombreuses méthodes existent pour reproduire des structures tubulaires à l'intérieur de dispositifs microfluidiques qui sont ensuite endothélialisés. Les méthodes classiques seront d'abord présentées dans cette section, puis une description plus détaillée des méthodes mises en œuvre dans ce travail, la focalisation hydrodynamique et la digitation visqueuse, sera donnée.

#### 1.2.1.1 Méthodes classiques

Les méthodes de structuration permettant de fabriquer des tubes dans des puces microfluidiques sont sensiblement les mêmes que celles présentées précédemment pour les OoCs. Elles consistent, par exemple, à fabriquer directement les puces microfluidiques avec l'architecture souhaitée, notamment avec des plots [91], [120], des canaux comportant des bifurcations [121] (Figure 1-11 C), ou une membrane poreuse [122]. Si ces techniques sont avantageuses par la facilité de leur mise en œuvre, elles ont toutefois le défaut important de faire intervenir des obstacles physiques non physiologiques au contact des cellules (plots ou membrane). Il est également possible de structurer un hydrogel contenu dans les dispositifs microfluidiques à l'aide d'un moule sacrificiel qui sera ôté (comme une aiguille) [30], [123] (Figure 1-11 A) ou dissout [124] (Figure 1-11 B) grâce à l'ablation laser [40] (Figure 1-11 D), ou *via* le moulage de celui-ci préalablement au scellage de la puce [80] (Figure 1-11 E). Ces approches permettent un contrôle précis des dimensions finales du vaisseaux reproduit, toutefois elles demandent des étapes d'alignement ou des manipulations minutieuses qui limitent potentiellement leur fabrication à moyen ou haut débit. De même que pour les OoCs, l'impression 3D

par extrusion ou stéréolithographie sont également des approches utilisées pour la fabrication de vaisseaux sur puce [45] (Figure 1-11 F). Leur principal avantage est la fabrication couche par couche qui permet de reproduire des géométries complexes, cependant, ce sont des méthodes assez onéreuses à mettre en place et elles demandent également une quantité de cellules élevées pour l'ensemencement, ce qui peut être problématique selon la source cellulaire. Enfin, il est possible de laisser les cellules s'autoassembler au sein d'un hydrogel pour former un réseau vasculaire perfusable [125](Figure 1-11 G). Cependant et contrairement aux autres techniques citées précédemment, cette méthode ne permet pas de contrôler la structure finale obtenue. L'ensemble de ces techniques ainsi que les paramètres des tubes qu'elles permettent de générer sont récapitulés dans le Tableau 1-4.

Tableau 1-4 Techniques de structuration des vaisseaux sur puce

Méthode	Type de structure générée	Équipement supplémentaire nécessaire à la fabrication	Largeur typique des tubes générés	Modèles
Fonctionnalisation de surface	Motifs 2D	Oui	Non applicable	[126]
Structuration des canaux microfluidiques	Tube 3D, section rectangulaire	Non	100-1000µm	[91], [120], [121], [127], [128]
Membrane poreuse	Monocouche 2D	Non	Non applicable	[122]
Moule sacrificiel	Tube 3D	Non	100-600µm	[30], [123], [124], [129]–[131]
Autoassemblage	Réseau 3D	Non	5-100µm	[125], [132]–[134]
Moulage hydrogel	Tube 3D, Section rectangulaire	Non	100-200µm	[80], [135]
Bio impression : extrusion (additive) et stéréolithographie (soustractive)	Tube 3D, section ronde	Oui	5-50µm (méthode soustractive) 100-1000µm (méthode additive)	[45], [136]–[138]
Ablation laser	Tube 3D	Oui	10-50µm	[40], [139], [140]

Pour ce travail, nous avons choisi de mettre en œuvre deux autres méthodes ; la focalisation hydrodynamique et la digitation visqueuse, décrites ci-après. Elles ont été choisies en raison de leur haute biocompatibilité, de la possibilité de les adapter sur une chaîne robotisée dans l'optique d'une production à moyen débit et pour le peu d'instrumentation requis dans leur mise en œuvre.

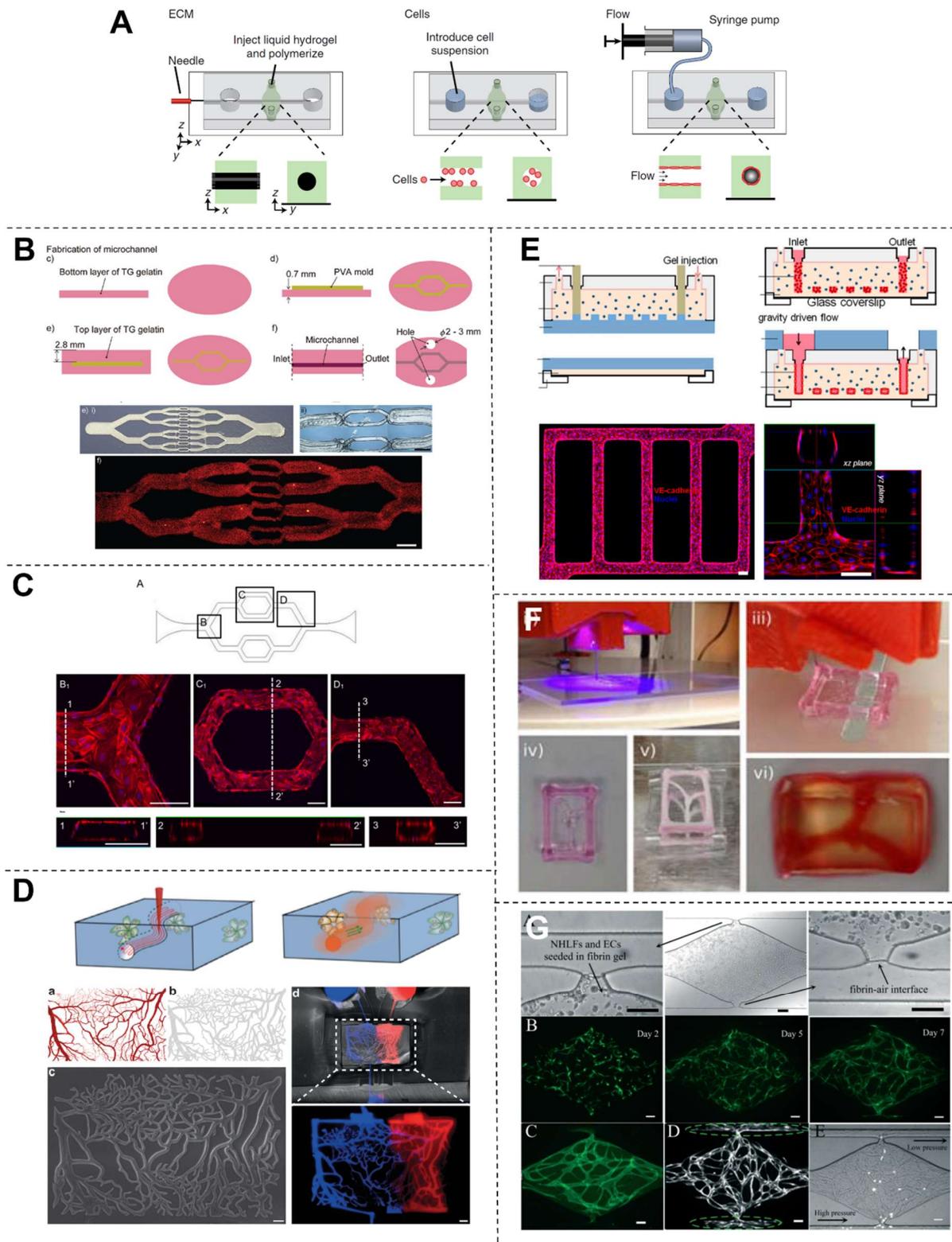


Figure 1-11 Exemples de techniques de fabrication de vaisseaux sur puce et les structures obtenues. A) et B) Moules sacrificiels : aiguille (A), adapté de [123] et polymère à dissoudre (B), adaptée de [57]. C) Structuration des canaux microfluidiques, adapté de [121]. D) Ablation laser, adapté de [40]. E) Moulage d'hydrogel, adapté de [80]. F) Bio printing, adapté de [138] G) Auto assemblage, adapté de [134].

### 1.2.1.2 Théorie des écoulements dans des canaux microfluidiques

Les deux méthodes présentées ci-après s'appuient sur la physique des écoulements dans les microcanaux. L'écoulement de fluides incompressibles visqueux newtoniens est décrit par l'équation de Navier-Stokes :

$$\underbrace{\rho \frac{\partial \vec{v}}{\partial t}}_{\text{terme inertiel}} + \underbrace{\rho (\vec{v} \cdot \vec{\nabla}) \vec{v}}_{\text{terme convectif}} = \underbrace{\rho \vec{g}}_{\text{pesanteur}} - \underbrace{\vec{\nabla} p}_{\text{pression}} + \underbrace{\eta \Delta \vec{v}}_{\text{viscosité}}$$

Équation 1 : Equation de Navier-Stokes

Or, dans un canal microfluidique, le nombre de Reynolds (Re) est très faible, les écoulements sont donc laminaires et les forces visqueuses dominent ce qui permet de négliger le terme convectif, le terme inertiel et la pesanteur. On a alors l'équation simplifiée suivante :

$$\nabla \vec{p} + \mu \Delta \vec{u} = \vec{0}$$

Équation 2 : Equation de Navier-Stokes simplifiée pour un écoulement microfluidique.

Dans les canaux microfluidiques, on considère également que la condition de non-glissement sur les parois est valide. On est alors dans le cas d'un écoulement de Poiseuille (Figure 1-12) qui se traduit par l'Équation 3 :

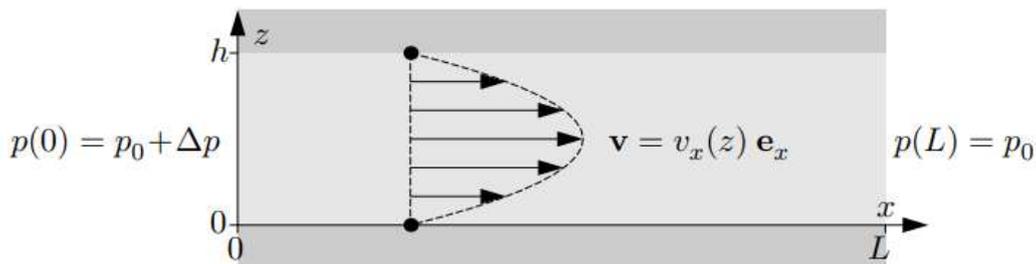


Figure 1-12 Ecoulement de Poiseuille, adapté de [141]

$$v_z(r) = \frac{\Delta P R^2}{4\eta L} \left( 1 - \left( \frac{r}{R} \right)^2 \right)$$

Équation 3 Vitesse locale du fluide dans un écoulement de Poiseuille

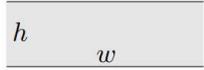
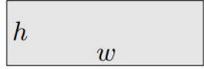
Après intégration sur la section du canal, celle-ci permet d'obtenir une relation linéaire entre le débit Q au sein du canal et la différence de pression ΔP entre l'entrée et la sortie de celui-ci (Équation 4).

$$\Delta P = R_h \cdot Q$$

Équation 4 : Relation linéaire reliant le débit et la différence de pression dans un canal microfluidique

Les valeurs de résistance hydraulique  $R_h$  en fonction de la section du canal sont données dans le Tableau 1-5.

Tableau 1-5 Résistance hydraulique en fonction de la section du canal, adapté de [141]

shape		$R_{\text{hyd}}$ expression	$R_{\text{hyd}}$ [10 <sup>11</sup> $\frac{\text{Pa}\cdot\text{s}}{\text{m}^3}$ ]
circle		$\frac{8}{\pi} \eta L \frac{1}{a^4}$	0.25
ellipse		$\frac{4}{\pi} \eta L \frac{1 + (b/a)^2}{(b/a)^3} \frac{1}{a^4}$	3.93
triangle		$\frac{320}{\sqrt{3}} \eta L \frac{1}{a^4}$	18.48
two plates		$12 \eta L \frac{1}{h^3 w}$	0.40
rectangle		$\frac{12 \eta L}{1 - 0.63(h/w)} \frac{1}{h^3 w}$	0.51
square		$\frac{12 \eta L}{1 - 0.917 \times 0.63} \frac{1}{h^4}$	2.84

On peut également appliquer l'équation de Poiseuille à l'écoulement de deux fluides de viscosité différentes dans des phases séparées. L'emplacement de  $h^*$ , et donc la largeur de chaque phase, sera déterminé par la viscosité  $\eta_1$  et  $\eta_2$  de chaque fluide (Figure 1-13).

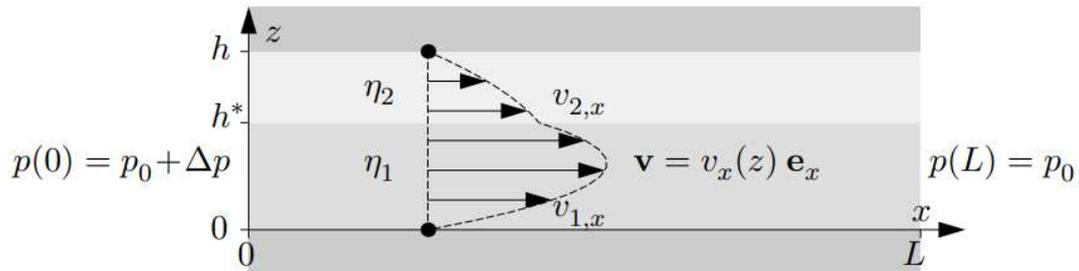


Figure 1-13 Ecoulement de Poiseuille pour un écoulement à deux phases, adapté de [141]

De plus, en microfluidique, ce sont les phénomènes de diffusion qui dominent avec un nombre de Peclet ( $Pe$ ) inférieur à 1. La mise en contact de deux milieux n'entraînera qu'un mélange par diffusion.

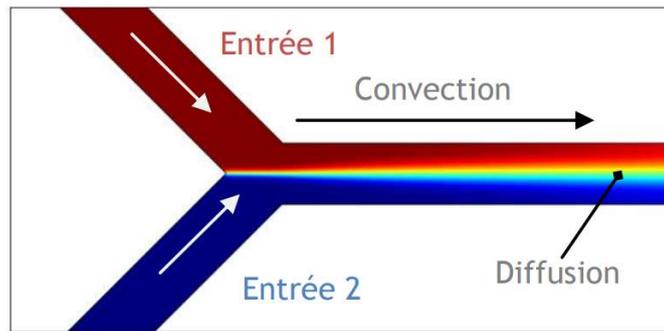


Figure 1-14 Simulation de l'écoulement de deux fluides dans un canal microfluidique, adapté de [142]

### 1.2.1.3 Focalisation hydrodynamique d'hydrogels

La focalisation hydrodynamique ou *flow focusing* repose sur cette dernière notion d'écoulement multiphasique dans un canal microfluidique. Elle est couramment utilisée pour plusieurs applications biologiques comme le tri cellulaire [143], la fonctionnalisation sélective de surface [144] ou la génération d'émulsion [145], [146]. L'idée d'utiliser la focalisation hydrodynamique pour structurer des hydrogels a d'abord été évoquée pour des applications d'immobilisation de cellules et de leur mise en culture [147], [148], en s'appuyant respectivement sur les propriétés de gélification de l'alginate au contact de calcium et sur la gélification d'un hydrogel à base de collagène et de Puramatrix au contact du milieu de culture (Figure 1-15). Cette approche nécessite donc d'utiliser un matériau qui gélifie au contact d'une espèce chimique.

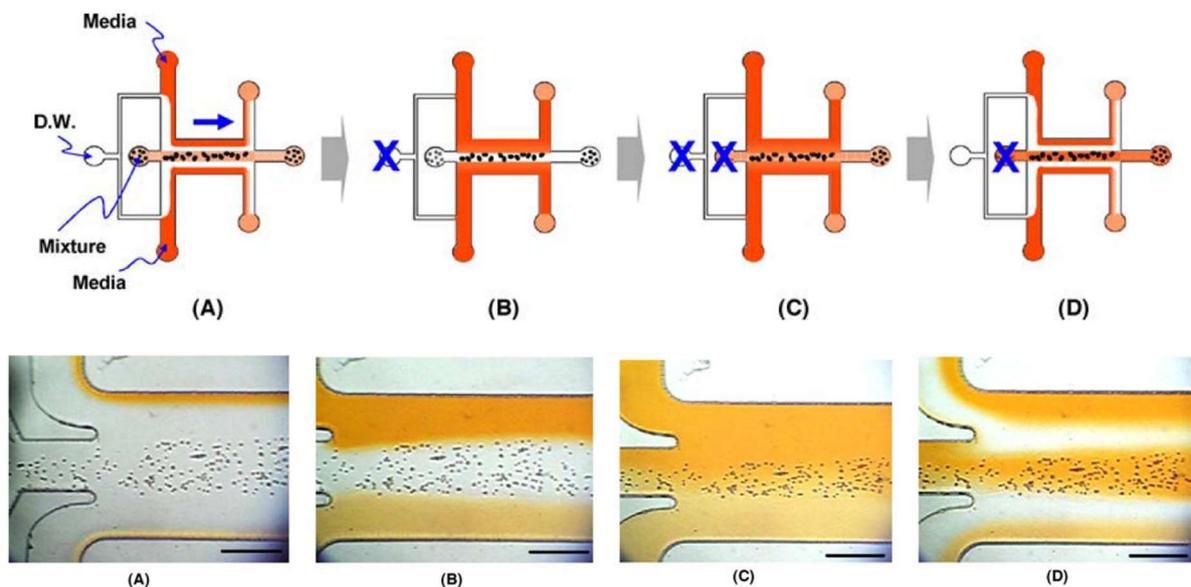


Figure 1-15 Emprisonnement par focalisation hydrodynamique et culture de cellules dans un gel de collagène et de Puramatrix, adapté de [148].

La focalisation hydrodynamique a également été appliquée avec du Matrigel, un hydrogel thermoréticulable [26], permettant de créer une structure alternant des blocs d'hydrogel et des espaces remplis de milieu où des cellules ont été ensuiteensemencées.

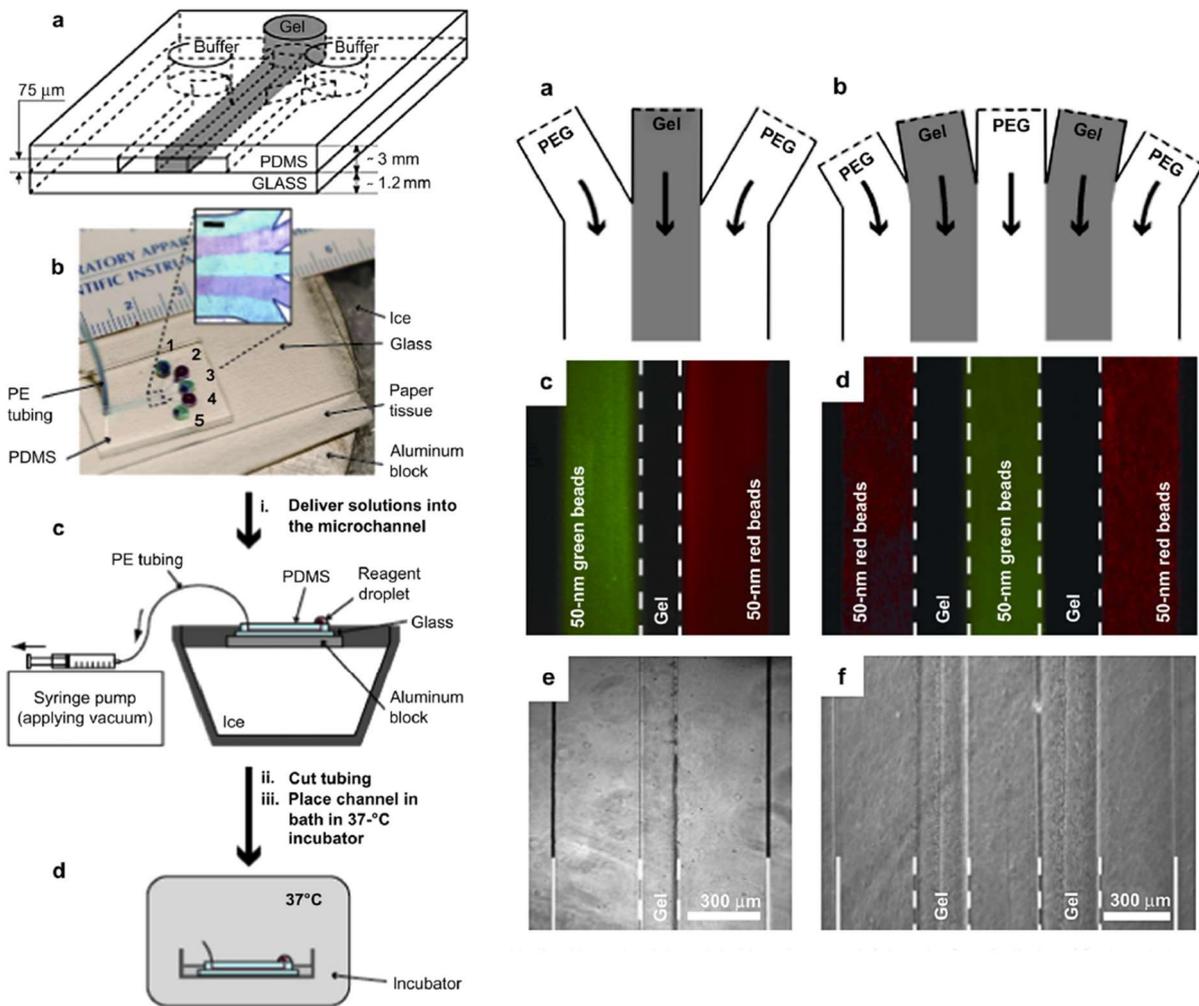


Figure 1-16 Focalisation hydrodynamique de Matrigel, adapté de [26].

La taille des « canaux » d'hydrogel obtenus par cette technique dépend non seulement de la différence de viscosité entre l'hydrogel et la solution secondaire utilisée mais également de la pression appliquée sur les entrées fluidiques. En contrôlant indépendamment les entrées en pression, on peut moduler la taille relative des phases (Figure 1-17 et Équation 5), et ainsi générer un vaisseau à la taille souhaitée. Il est également possible de moduler la taille des phases en adaptant les résistances fluidiques de chaque entrée comme le montre l'Équation 5.

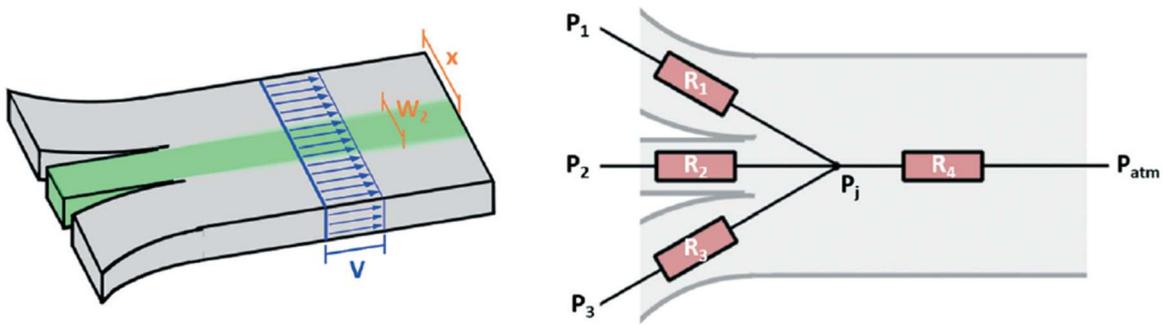


Figure 1-17 Schématisation des résistances fluidiques dans un dispositif de focalisation hydrodynamique, adapté de [149]

$$Q_n = \frac{P_n}{R_n} \cdot \frac{\frac{P_1}{R_1} + \frac{P_2}{R_2} + \frac{P_3}{R_3}}{\frac{R_n}{R_1} + \frac{R_n}{R_2} + \frac{R_n}{R_3} + \frac{R_n}{R_4}}$$

Équation 5 :  $Q_n$  : flux dans le canal  $n$  ;  $R_n$  : Résistance hydraulique du canal  $n$  ;  $P_n$  : pression appliquée au canal  $n$

Cette approche permet donc de générer une structure tubulaire à section rectangulaire avec un hydrogel, celle-ci pouvant par la suite êtreensemencée de cellules. Elle peut être utilisée directement, sans modification chimique, avec des hydrogels biocompatibles chimiquement ou thermiquement réticulés et n'implique pas la présence de corps étranger rigide (micro-plots) au contact des cellules.

C'est l'une des méthodes que nous avons choisi de mettre en œuvre dans ce travail, notamment avec un hydroscaffold d'acide hyaluronique et un hydrogel de collagène I.

#### 1.2.1.4 Modelage par digitation visqueuse ou viscous finger patterning

Les propriétés d'un écoulement biphasique peuvent être exploitées d'une façon différente. Le modelage par digitation visqueuse ou *Viscous Finger Patterning (VFP)* consiste à générer une structure creuse au sein d'un hydrogel en exploitant la différence de viscosité entre deux fluides. En effet, lorsqu'un fluide moins visqueux déplace un fluide plus visqueux, il forme un doigt à l'intérieur de celui-ci. Ce phénomène a d'abord été reporté et théorisé par *Saffman et Taylor* en 1958 [150] (Figure 1-18).

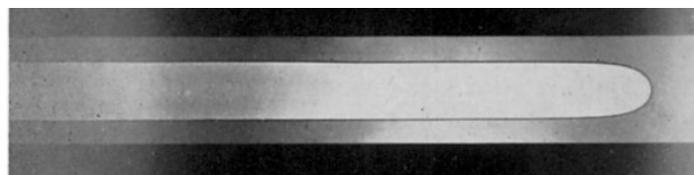


Figure 1-18 Doigt d'eau (gris clair) pénétrant dans de l'huile (gris moyen), adapté de [150]

Cette instabilité a été analysée et simulée notamment grâce à la méthode de lattice Boltzmann, permettant de comprendre quels paramètres influencent la taille et la forme du doigt créé dans un canal [151]–[153]. Ces simulations ont permis de montrer que la vitesse du fluide moins visqueux lorsqu'il pénètre dans le fluide plus visqueux a un fort impact sur l'apparition ou non du doigt (Figure 1-19 A). Le rapport entre les viscosités des deux fluides affecte, quant à lui, la largeur du doigt généré ; plus il est élevé plus le doigt sera fin [151]. La gravité influence elle aussi la forme de la structure

obtenue. Lorsqu'elle est prise en compte dans les simulations le doigt se forme sur la partie basse du canal [152], [153] (Figure 1-19 B). Enfin la formation du doigt est affectée par l'angle de contact entre le fluide le moins visqueux et la surface du canal, c'est-à-dire sa mouillabilité. Si celle-ci est trop faible, la longueur du doigt risque d'être drastiquement diminuée (Figure 1-19). Ces observations permettent de conclure que, pour appliquer cette méthode afin de générer une structure au sein d'un hydrogel, il est nécessaire d'avoir une grande différence de viscosité entre celui-ci et le fluide qui servira à le creuser. Il faudra également que le fluide moins visqueux bénéficie d'une vitesse suffisante et que le canal microfluidique soit hydrophobe.

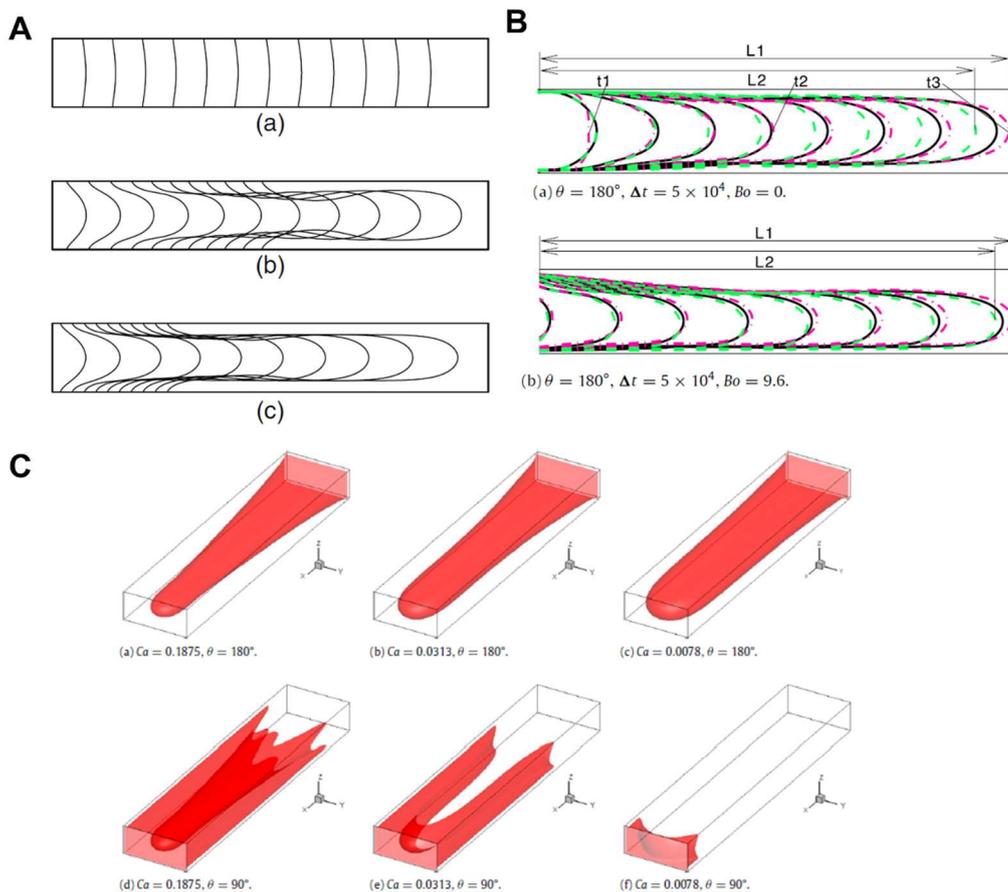


Figure 1-19 A) Simulation de la structure formée pour une vitesse  $u=0.01$  (a),  $0.05$  (b),  $0.1$  (c), adapté de [151] B) Effet de la gravité sur la forme du doigt, sans gravité (a), avec gravité (b), adapté de [153] C) effet de l'angle de contact du fluide moins visqueux avec la surface du canal, adapté de [153].

La première application de ce phénomène à la structuration d'un hydrogel pour la fabrication d'un vaisseau sur puce a été réalisée avec une puce en PDMS, un gel de collagène I et du tampon phosphate salin (PBS) [93]. Le PBS est passé à travers le collagène, puis ce dernier a été thermiquement réticulé pour figer la structure générée. Un lumen de collagène a donc ainsi été obtenu et a ensuite pu êtreensemencé avec des cellules endothéliales.

Pour mettre en mouvement le PBS au sein du collagène sous sa forme liquide non gélifiée, cette approche s'appuie sur le pompage passif ou *passive pumping* (PP) [154] qui consiste à créer une différence de pression entre l'entrée et la sortie d'un canal microfluidique en y déposant des gouttes de liquide de volumes différents. D'après l'Équation 6, plus une goutte est petite, plus sa pression

interne sera élevée. À l'inverse plus le volume de la goutte est grand, plus sa pression interne sera proche de la pression atmosphérique.

$$\Delta P = \frac{2\gamma}{R}$$

Équation 6 :  $\Delta P$  : différence de pression entre l'intérieur de la goutte et la pression atmosphérique ;  $\gamma$  : énergie de surface du liquide ;  $R$  : rayon de la goutte déposée.

Le fluide sera alors mis en mouvement en suivant l'Équation 7. Ce processus est illustré Figure 1-20.

$$\frac{dV}{dt} = \frac{1}{Z} \left( \rho g L - \frac{2\gamma}{R} \right)$$

Équation 7 :  $V$  : débit volumétrique ;  $Z$  : la résistance hydraulique du micro-canal ;  $\rho$  : densité du fluide de la goutte la plus large ;  $L$  : hauteur de la goutte la plus large.

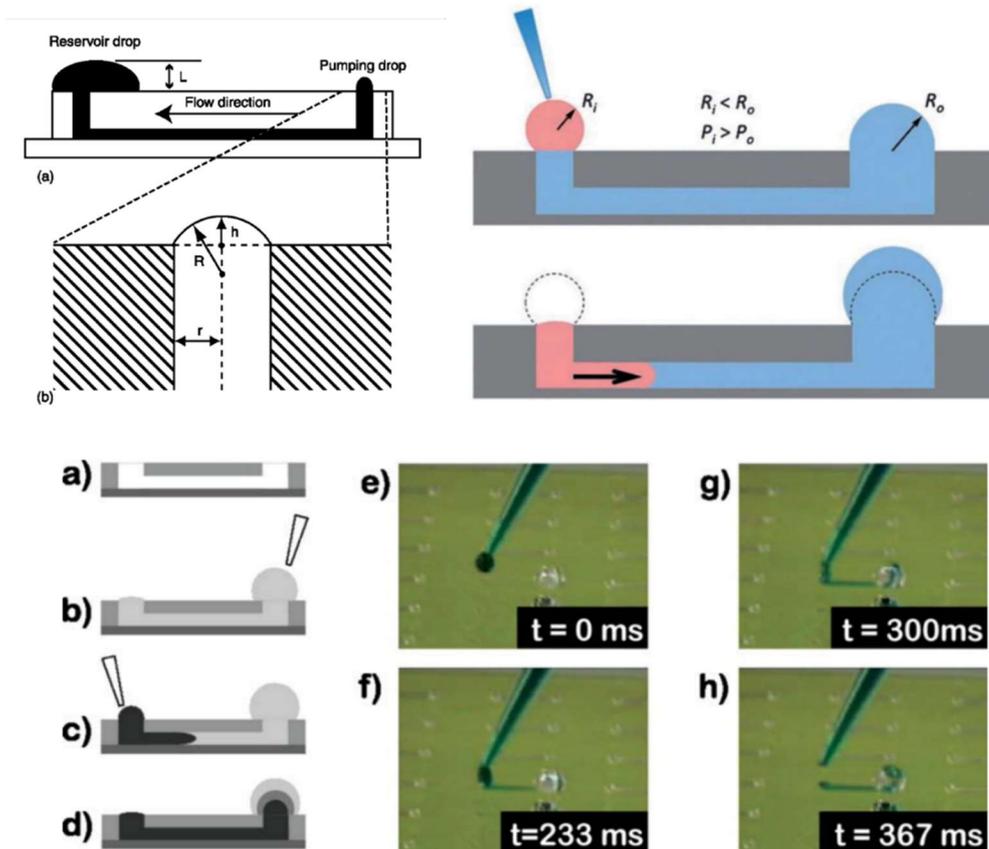


Figure 1-20 Principe du pompage passif dans une micro canal, adapté de [154]–[156]

Une autre procédure pour la mise en mouvement du fluide le moins visqueux est de créer une différence de pression hydrostatique en surélevant la goutte [32]. Ces différentes techniques (Figure 1-21) ont été comparées du point de vue de la taille du lumen généré par *de Graaf et al.* [157] qui concluent à la nécessité de standardiser les paramètres du VFP pour garantir une meilleure reproductibilité et une fabrication à plus large échelle.

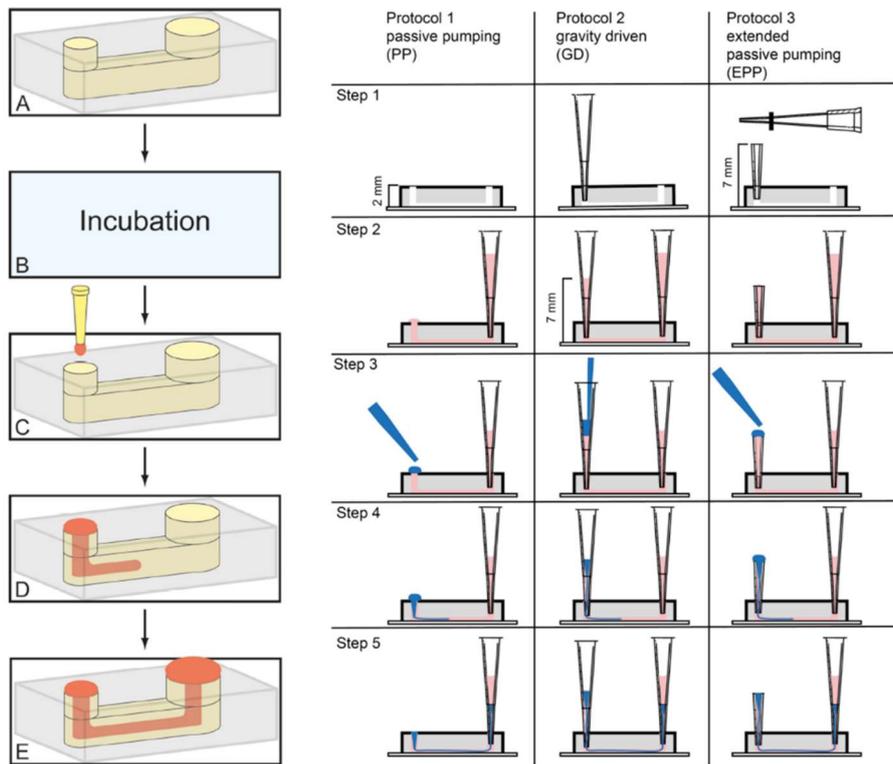


Figure 1-21 Différents protocoles de VFP, adapté de [157], [158]

Cette approche de VFP a été notamment utilisée pour la fabrication d'un modèle de vaisseau pour mimer la barrière hématoencéphalique [32] (Figure 1-22).

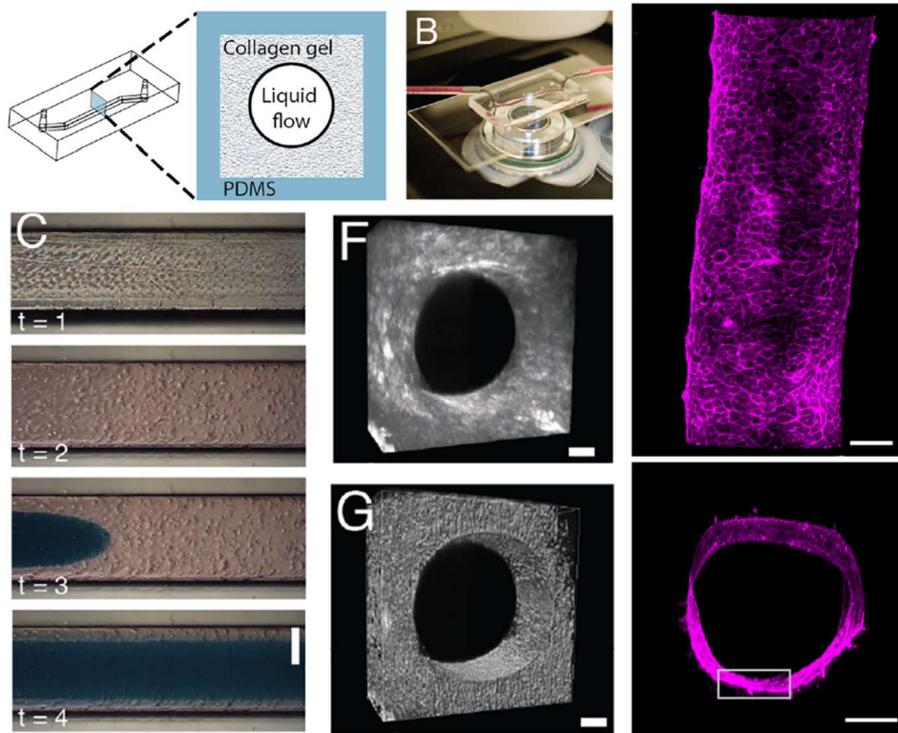


Figure 1-22 Modèle de barrière hématoencéphalique réalisé avec l'approche VFP, adaptée de [32]

La technique de VFP permet donc créer une structure tubulaire de section ronde au sein d'un hydrogel thermo-réticulable par des procédés passifs biocompatibles et ne nécessitant pas d'équipement supplémentaire. La simplicité de cette approche lui confère un réel potentiel pour une robotisation future et donc une fabrication à large échelle. C'est notamment pour ces raisons que nous avons choisi de l'utiliser dans ce travail pour la fabrication de vaisseaux sur puce.

## 1.2.2 Perfusion

Si la morphologie des vaisseaux est un aspect important à prendre en compte pour reproduire des modèles pertinents physiologiquement, la perfusion du système est également cruciale. Elle sert en particulier à contrôler les changements de milieu, les ajouts de molécules ou encore à appliquer aux cellules des contraintes de cisaillements adéquates.

Les cellules endothéliales sont affectées par deux types de forces liées au flux in vivo, la déformation cyclique due à la pression sanguine et les contraintes de cisaillement dues à la force de friction générée par le flux sanguin sur les cellules. Les contraintes de cisaillement déforment les cellules dans la direction du flux sanguin alors que la distension de la paroi a tendance à déformer les cellules dans toutes les directions (Figure 1-23). Lors du développement de vaisseaux sur puce, une attention particulière doit être apportée aux futures contraintes de cisaillement que les cellules subiront puisque celles-ci influencent fortement l'orientation et la fonctionnalité de l'endothélium [159].

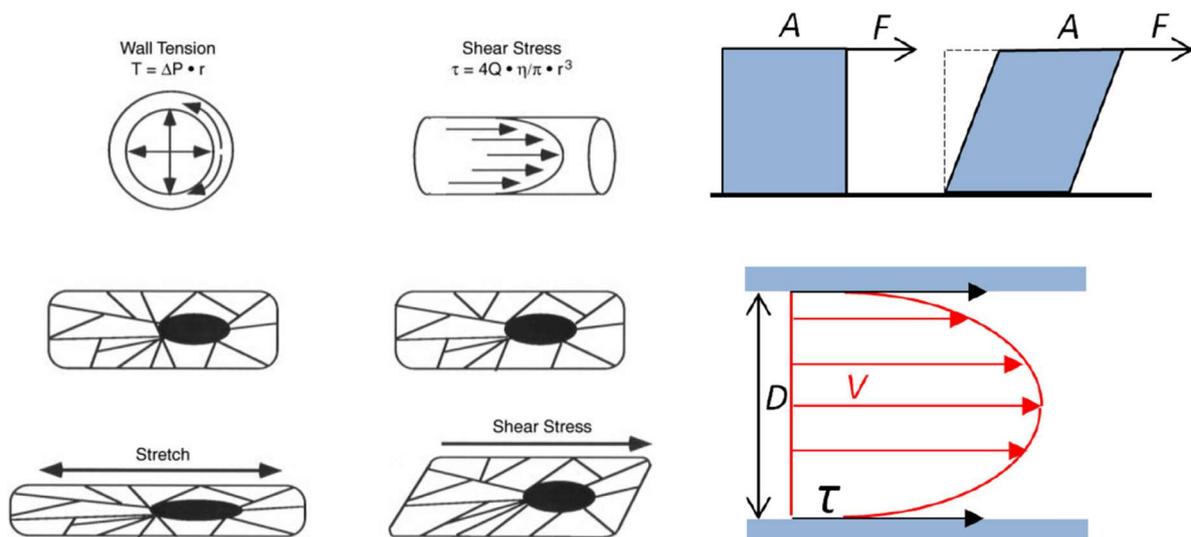


Figure 1-23 Forces hémodynamiques affectant les cellules (gauche) et schématisation des contraintes de cisaillement (droite), adapté de [160], [161].

Les contraintes des cisaillements se définissent comme le rapport entre les forces tangentielles imposées par le flux sur les cellules (F) et la surface (A) sur laquelle elles s'appliquent :

$$\tau = \frac{F}{A}$$

Équation 8 :  $\tau$  : contraintes de cisaillement ; F : forces tangentielle ; A : surface totale sur laquelle les forces s'appliquent.

Dans vaisseau cultivé dans un canal microfluidique ces forces de cisaillement s'exprime de la manière suivante :

$$\tau = \frac{r}{2} \times \frac{\Delta P}{L}$$

Équation 9 : r : rayon du vaisseau ;  $\Delta P$  : Différence de pression entre l'entrée et la sortie du vaisseau ; L : Longueur du vaisseau.

Les paramètres de flux choisis ont un fort impact sur la culture des vaisseaux sur puce et notamment sur l'orientation des cellules [162], [163](Figure 1-24). Ceux-ci sont donc définis en fonction de la situation biologique à mimer, pathologique ou non par exemple, ou du type de vaisseau à recréer.

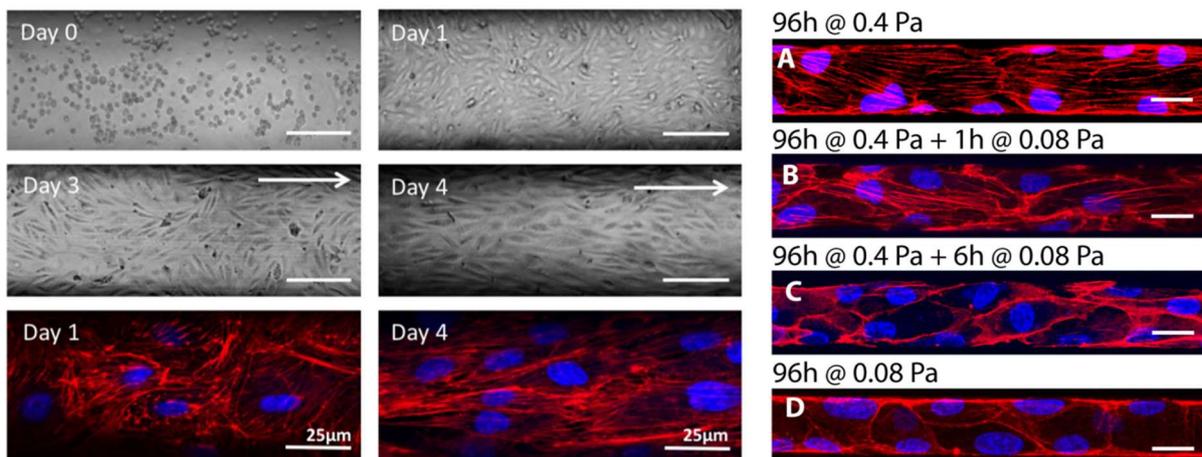


Figure 1-24 Morphologie des cellules endothéliales en conditions de flux. Evolution au cours du temps (gauche), adapté de [163]. Orientation des filaments d'actine en fonction de la différence de pression appliquée sur les vaisseaux sur puce (droite), adapté de [162]

Afin de mettre en flux les vaisseaux sur puce, il est nécessaire que l'instrumentation développée soit utilisable dans un environnement de culture cellulaire (hotte à flux laminaire stérile, incubateur) et compatible avec les systèmes d'analyse des dispositifs (microscopes, banc de mesure électrique).

Il existe différentes méthodes pour contrôler la perfusion de vaisseaux sur puces qui sont récapitulées dans le Tableau 1-6 et la Figure 1-25.

Tableau 1-6 : Méthodes de perfusion des vaisseaux sur puce, adapté de [164]

Méthode	Contrôle dynamique	Circuit de recirculation possible	Type de flux généré	Débit atteints
Gravité	Non	Non	Continu	~ 10nL/s

Osmose	Non	Non	Continu	~ 10 $\mu$ L/h
Pompage passif	Non	Non	Continu	~ 100nL/s
Pompe péristaltique	Oui	Oui	Pulsatile	~ 100 $\mu$ L-1mL/min
Pousse seringue	Oui	Oui	Continu, constant ou pulsatile	~ 1 $\mu$ L-100 $\mu$ L/min
Contrôleur de pression	Oui	Oui	Continu, constant ou pulsatile	~ 10 $\mu$ L/min ~10mL/h
Valve intégrée à la puce	Oui	Oui	Pulsatile	~ 100nL/s

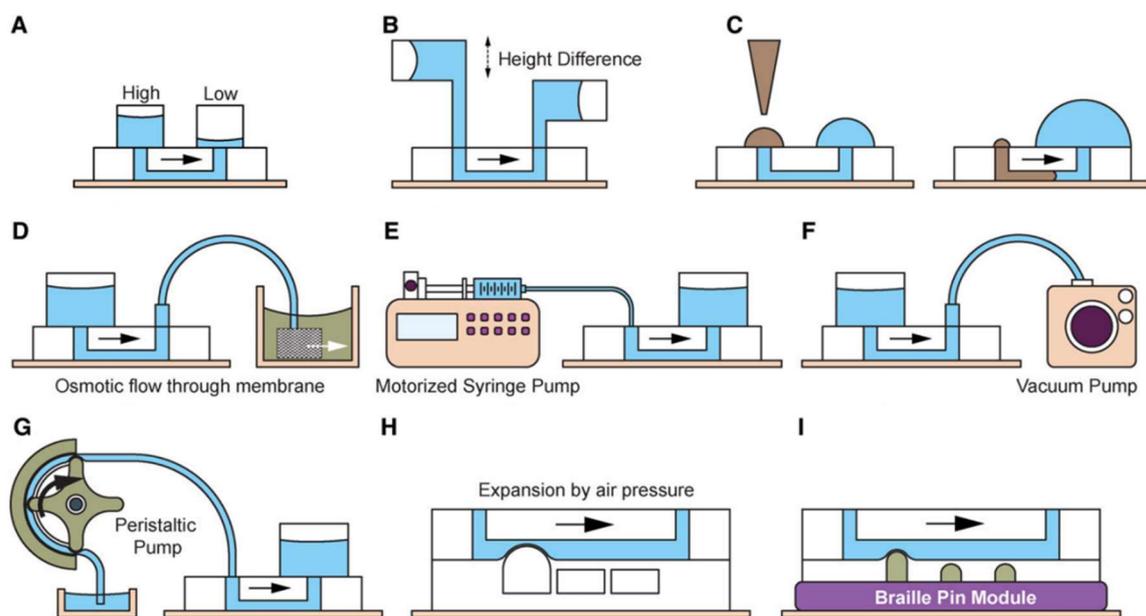


Figure 1-25 Schémas des types de pompes utilisées pour les dispositifs de culture cellulaire microfluidique. (A) Gravité avec réservoirs orientés verticalement, (B) Gravité avec réservoirs horizontaux, (C) Pompage passif basé sur la tension de surface, (D) Pompe osmotique, (E) Pousse seringue, (F) Contrôleur de pression négative (G) Pompe péristaltique externe, (H) Valves pneumatique intégrées (I) Pompe péristaltique intégrée par broches braille, adapté de [164]

Dans le cadre de ce travail, nous envisageons une perfusion basée sur l'utilisation de contrôleurs en pression négative en circuit ouvert dans un premier temps et en recirculation dans le futur.

## 1.3 MODELE BIOLOGIQUE DE VAISSEAUX SUR PUCE

### 1.3.1 Le réseau vasculaire

Le réseau vasculaire sanguin constitue un ensemble de conduits qui véhiculent le sang pompé par le cœur à travers tous les organes (Figure 1-26). C'est un réseau très ramifié, structurellement composé de vaisseaux de calibres différents. Si on considère la circulation principale (hors pulmonaire), le cœur pompe le sang dans le plus gros vaisseau de l'organisme, l'aorte (de diamètre d'environ 3cm), qui le distribue vers les organes à travers un réseau d'artères et d'artérioles de diamètre de plus en plus fin. Ces artérioles sont en continuité avec les capillaires sanguins qui sont les vaisseaux les plus fins (environ 8-10 $\mu$ m) intriqués au sein des tissus. Au-delà du réseau capillaire, le sang est collecté dans les veinules qui le déversent dans les veines et le ramènent au cœur [165]. Par définition, les artères sont les vaisseaux qui transportent le sang du cœur vers les organes et les veines sont les vaisseaux qui ramènent le sang vers le cœur, quel que soit son niveau d'oxygénation.

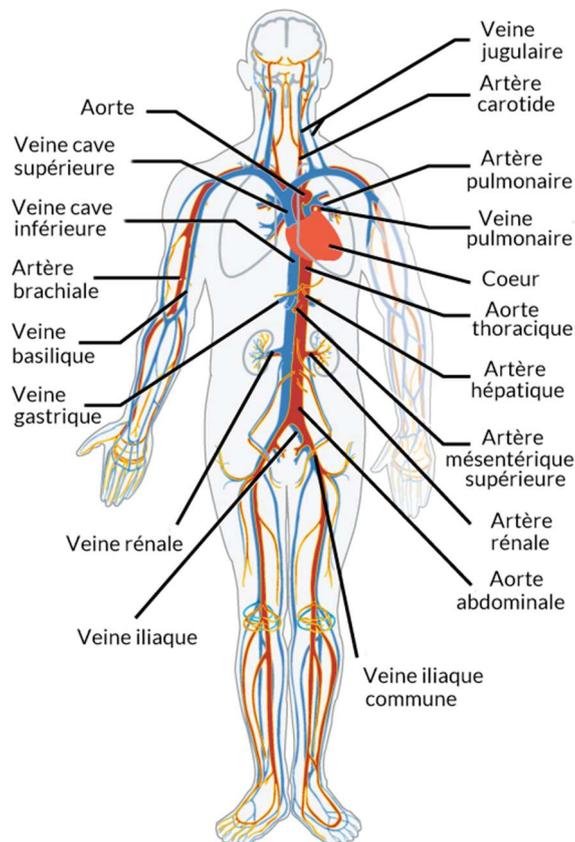


Figure 1-26 Schématisation de la circulation sanguine principale chez un être humain, adapté de [166]

Proportionnellement, la très grande majorité du réseau vasculaire n'est pas constituée des vaisseaux de gros calibres les plus connus anatomiquement mais par les plus petits vaisseaux, veinules et artérioles et, surtout, par les capillaires. Ainsi, on estime la longueur totale du réseau vasculaire d'un être humain adulte à une longueur d'environ 100000km, essentiellement par la prise en compte des capillaires [167]. En effet, les échanges gazeux se font au niveau des capillaires sanguins et, afin d'être correctement oxygéné, les tissus sont vascularisés avec un maillage d'environ 100-200 $\mu$ m dans toutes les dimensions. Ainsi, les capillaires forment le réseau vasculaire le plus complexe de l'organisme.

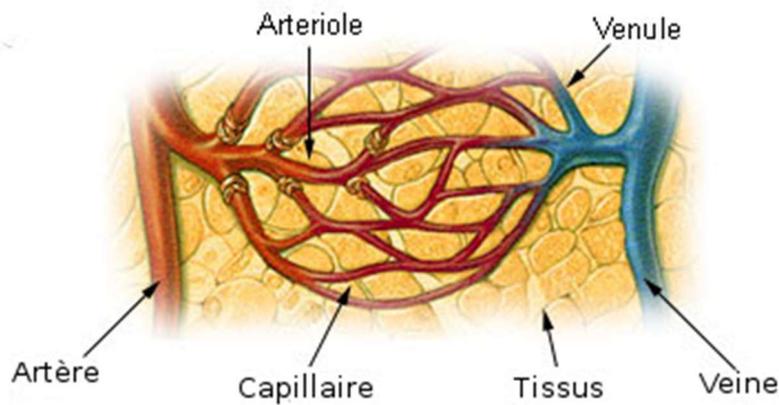


Figure 1-27 Schéma des capillaires sanguins dans les tissus, entre les artérioles et les veinules

D'un point de vue fonctionnel, on distingue les "vaisseaux élastiques", de gros diamètre, qui sont exposés à une pression sanguine importante et sont peu résistifs, des "vaisseaux de résistance", de plus petits calibres (artérioles) et qui régulent le flux sanguin par vasomotricité (vaso-constriction ou dilatation), protégeant ainsi le réseau capillaire d'un excès de pression, l'hypertension. Les "vaisseaux capacitifs" représentés par le système veineux ont essentiellement un rôle de collecte du sang postcapillaire pour le ramener au cœur dans des conditions hydrodynamiques plus calmes.

### 1.3.1.1 Structure des vaisseaux sanguins

Les vaisseaux sanguins sont composés de couches concentriques de cellules disposées autour d'une lumière centrale, le lumen. De l'intérieur vers l'extérieur, les cellules endothéliales forment la *tunica intima*, la face interne des vaisseaux sanguins sous la forme d'une monocouche continue, en contact direct avec la circulation sanguine. Les cellules périvasculaires, telles que les péricytes associés aux capillaires et les cellules musculaires lisses associées aux vaisseaux de plus gros calibre, sont organisées en strates concentriques disposées autour de l'endothélium et forment la *tunica média*. Elles sont séparées de l'endothélium par une fine couche de matrice extracellulaire, la lame basale. Selon le calibre et les forces hémodynamiques auxquelles ils sont soumis, les gros vaisseaux sont composés d'une ou de plusieurs couches de cellules musculaires lisses. Les artères possèdent de nombreuses fibres élastiques qui participent, avec la contraction des cellules musculaires lisses, à la régulation du flux sanguin [168]. Dans les plus gros vaisseaux, une troisième couche plus externe, l'*adventice*, est composée de tissu conjonctif et peut être elle-même vascularisée et innervée (Figure 1-28).

Cet arrangement structurel est essentiel à la physiologie des vaisseaux sanguins. L'endothélium est une barrière active et sélective aux cellules et aux métabolites circulants. De par sa localisation luminale, l'endothélium joue également un rôle essentiel dans la régulation du tonus vasculaire, de la thrombose et de la réponse immunitaire. Les cellules périvasculaires de type péricytes, situées du côté basal de l'endothélium, établissent des contacts cellulaires et des communications avec les cellules endothéliales. Elles sont essentielles à l'intégrité de la barrière vasculaire. Les cellules musculaires lisses des artérioles et des veinules participent également à la résistance structurelle des vaisseaux et régulent le flux sanguin via la vasomotricité [169].

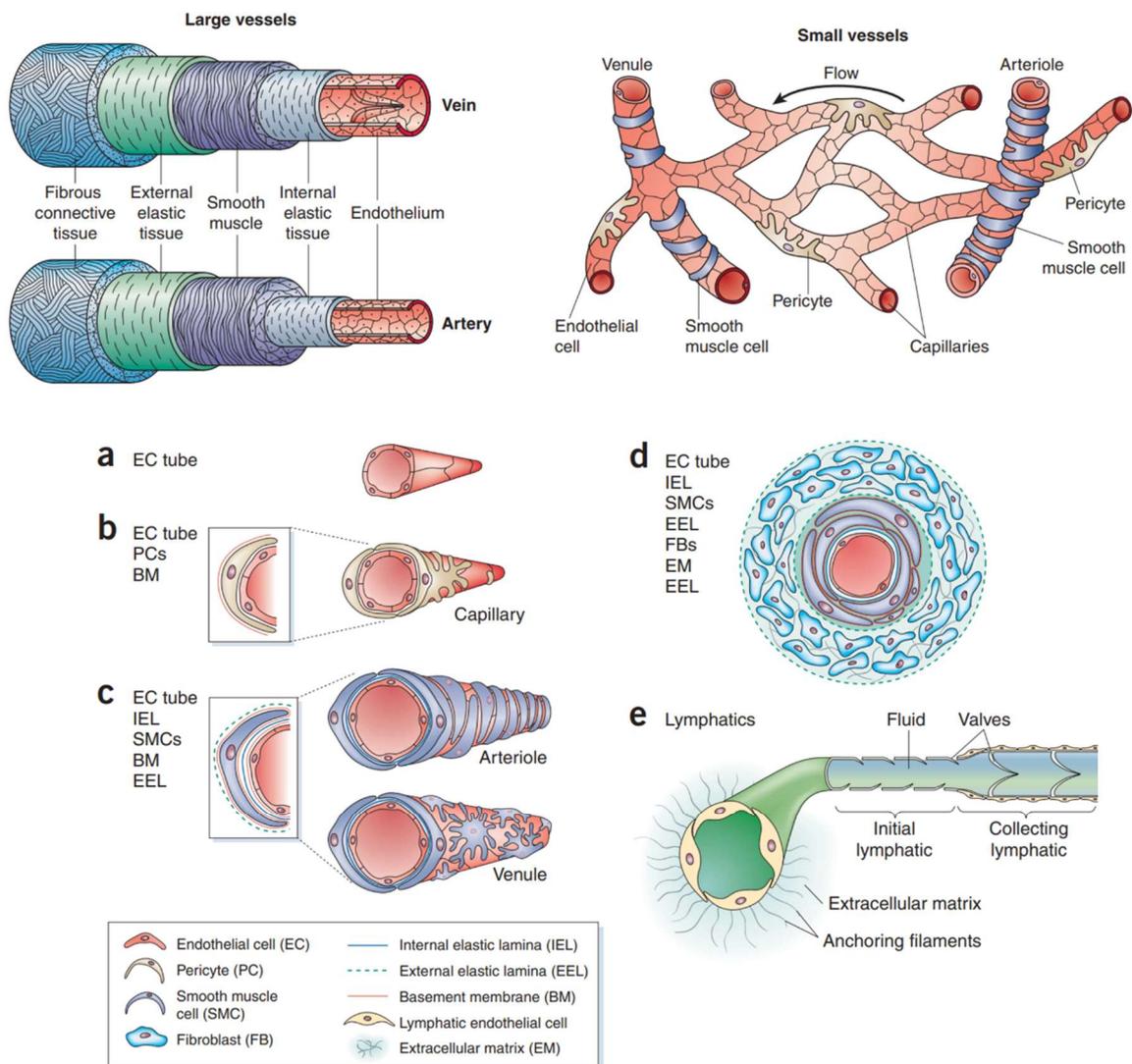


Figure 1-28 Structures schématiques de différents vaisseaux sanguins. a. Capillaire néoformé, immature. b. Capillaire mature. c. Artériole et veinule. d. Gros vaisseau. Cellules endothéliales (EC), Péricytes (PC), Cellules musculaires lisses (SMCs), Fibroblastes (FB), Limitante élastique interne (IEL), Limitante élastique externe (EEL), Membrane basale (BM), Matrice extracellulaire (EM), adapté de [168], [170].

### 1.3.2 Structure de l'endothélium vasculaire

L'endothélium vasculaire forme une monocouche continue dans la plupart des organes. Selon le contexte tissulaire, les endothelia présentent différents phénotypes, d'une barrière très restrictive à une absence quasi totale de capacité de rétention des fluides ou des cellules. Ainsi, au niveau du système nerveux central, l'endothélium est majoritairement continu, très sélectif au passage des composés et forme la barrière hématoencéphalique. On retrouve également des endothelia continus au niveau du cœur, des muscles, des poumons et des gros vaisseaux sanguins. Une différenciation très particulière de certains endothelia est la présence de fenestrations, des pores d'environ 100nm  $\varnothing$  qui perforent littéralement de part en part la membrane plasmique des cellules endothéliales qui, de fait, n'opposent que peu ou aucune résistance au passage des fluides et métabolites. On retrouve ces

endothélia fenêtrés au niveau du glomérule rénal, des villosités de l'intestin grêle, des glandes endocrines, du plexus choroïde et des sinusoides du foie. Ces fenestrations comportent un diaphragme dans tous ces tissus, sauf au niveau des cellules endothéliales sinusoidales du foie. Enfin, certains endothelia sont discontinus au niveau de leur jonctions intercellulaires, entraînant la formation d'espaces d'échanges très larges entre les cellules endothéliales, qui permettent le passage de fluides, de métabolites et même de cellules entières (moëlle osseuse, rate).

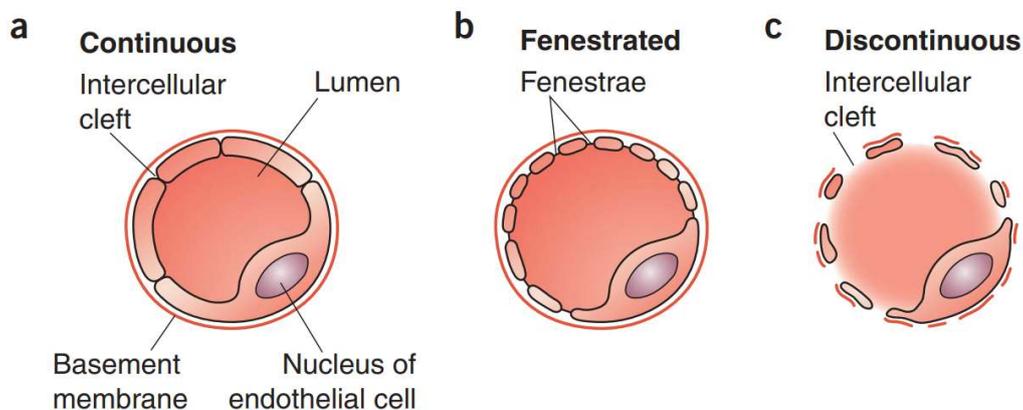
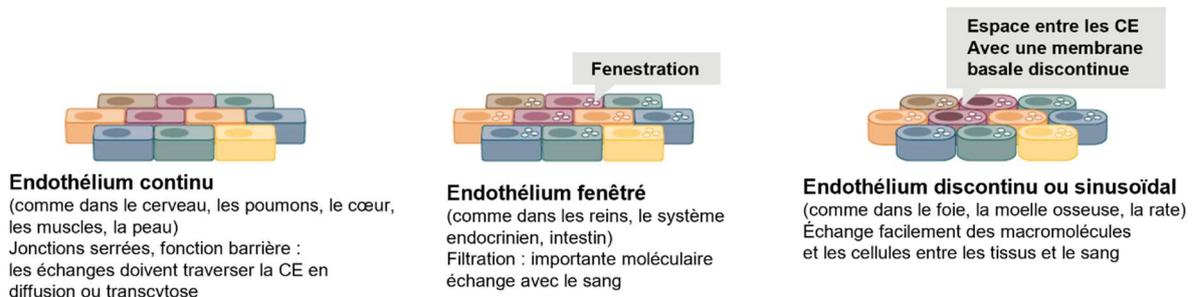
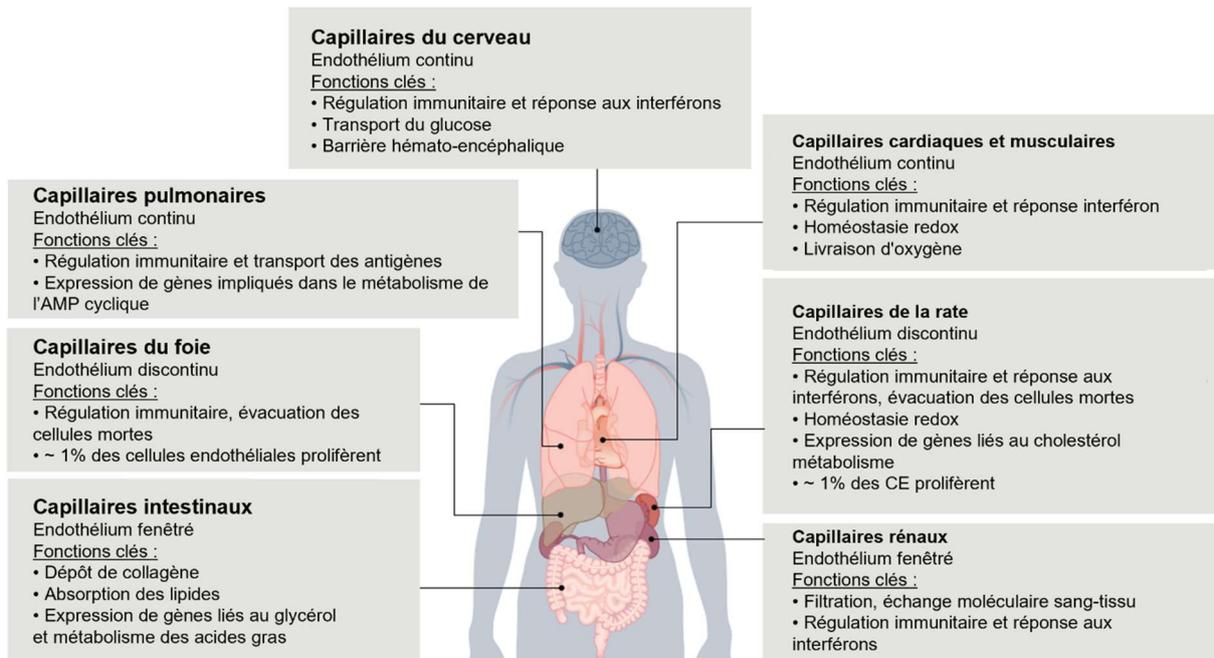


Figure 1-29 Schéma et localisations des différents types d'endothélia, adapté de [169], [170]

### 1.3.2.1 Les jonctions inter-endothéliales

Dans les endothélia continus, le rôle de barrière est dû à la présence de jonctions adhérentes et de jonctions serrées qui parcourent de façon continue la périphérie de chaque cellule de la monocouche endothéliale et lui confèrent son intégrité.

#### 1.3.2.1.1 Les jonctions adhérentes

Les jonctions adhérentes participent majoritairement au rôle de barrière des endothelia en formant une structure continue entre cellules adjacentes. Dans les cellules endothéliales, les jonctions adhérentes sont constituées, dans leur partie extracellulaire, de VE-cadhérine, une protéine transmembranaire qui permet à deux cellules endothéliales adjacentes de s'accoler par interactions homophiles VE-cadhérine/VE-cadhérine via ses domaines extracellulaires. Le domaine cytoplasmique de la VE-cadhérine s'associe au cytosquelette d'actine via des interactions avec la plakoglobine, la bêta-caténine et p120. La VE-cadhérine interagit également avec des récepteurs à certains facteurs de croissance (VEGFR2, FGFR1, TGF $\beta$ -R2 & VEGFR3) ancrés dans la membrane plasmique des cellules endothéliales dans une régulation de signalisation croisée (Figure 1-30). L'interaction entre les VE-cadhérines de cellules adjacentes est modulée par la phosphorylation de tyrosines présentes dans leur domaine intracellulaire. Cette phosphorylation est notamment contrôlée par la VE-PTP qui, lorsqu'elle est présente à la membrane et associée à la VE-cadhérine stabilise cette dernière au niveau de la jonction adhérente [171].

Au niveau fonctionnel, la VE-cadhérine contrôle, d'une part, la perméabilité endothéliale et, d'autre part, elle participe aussi au contrôle de la quiescence endothéliale à confluence [172] et à la transmigration des cellules immunes.

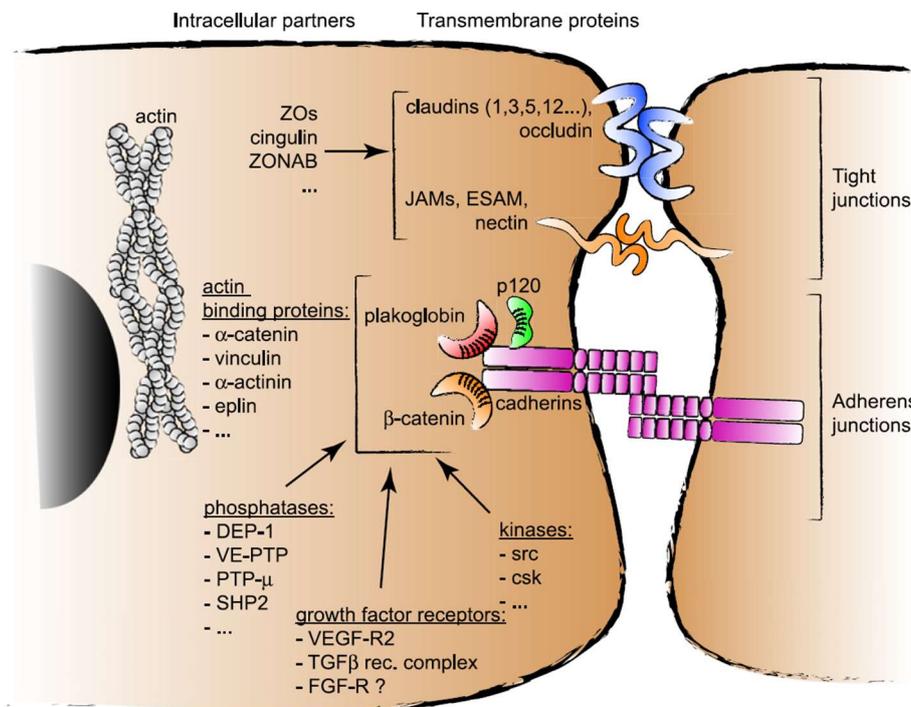


Figure 1-30 Schéma des jonctions adhérentes et des jonctions serrées dans les cellules endothéliales, adapté de [173]

Lors de ce travail, nous avons visualisé les jonctions adhérentes par immunomarquage de la VE-cadhérine.

#### 1.3.2.1.2 Les jonctions serrées

Les jonctions serrées sont constituées essentiellement de claudines, occludines et *junctional adhesion molecules* pour la partie extracellulaire/transmembranaire et des protéines Zona Occludens au niveau intracellulaire de la membrane plasmique. La protéine ZO-1 est localisée au niveau de la face intérieure de la membrane plasmique. C'est un adaptateur moléculaire qui interagit, d'une part, avec les occludines et les *junctional adhesion molecules* et, d'autre part, avec le cytosquelette d'actine (Figure 1-30). ZO-1 régule indirectement la jonction adhérente dans les cellules endothéliales [174]

Lors de ce travail, nous avons visualisé les jonctions serrées par immunomarcage de la protéine ZO-1.

### 1.3.3 Fonctions de l'endothélium des vaisseaux sanguins

L'endothélium vasculaire possède de nombreuses fonctions. La diffusion de l'oxygène et des éléments nutritifs aux organes et l'élimination des déchets se font à travers l'endothélium des capillaires sanguins. L'endothélium régule également le tonus vasculaire par la production de NO via la NO-synthase 3 qui va induire la relaxation des cellules musculaires lisses des vaisseaux sanguins à travers une guanylate cyclase. Cette vasomotricité régulée par l'endothélium contrôle directement le débit sanguin. L'endothélium participe également à l'hémostase, qui est le processus physiologique permettant l'arrêt des saignements [175]. Ainsi, l'endothélium forme une surface non thrombogène qui empêche, en conditions normales, le sang de coaguler dans les vaisseaux sanguins. Par exemple, une altération ou la disparition de l'endothélium, telle qu'observée lors de la rupture de la plaque d'athérome, est à l'origine de la formation d'un thrombus et, en conséquence, de l'infarctus du myocarde lorsque ce phénomène a lieu dans les artères coronaires. L'endothélium participe également à la formation des vaisseaux par angiogenèse, le processus qui consiste en la mise en place de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux préexistants. Ce phénomène est essentiel au cours de l'embryogenèse et de la mise en place des vaisseaux sanguins, il est également impliqué dans plusieurs pathologies chez l'adulte, notamment les cancers des tissus solides ou les rétinopathies vasoprolifératives [176].

Dans ce travail, nous avons analysé deux autres réponses fonctionnelles de l'endothélium qui sont l'activation inflammatoire et la perméabilité vasculaire.

#### 1.3.3.1 Endothélium et réponse inflammatoire

L'endothélium joue un rôle important dans la réponse immunitaire car il permet l'extravasation des cellules immunitaires présentes dans la circulation sanguine vers les tissus inflammés. En conditions normales, l'endothélium est "non-activé", c'est à dire non-thrombotique et non-adhérent pour les leucocytes circulants [177]. Au cours de l'inflammation et sous la stimulation de cytokines pro-inflammatoires telles le *tumor necrosis factor alpha* (TNF $\alpha$ ) ou l'interleukine 1 (IL-1), les cellules endothéliales sont "activées" et expriment alors, notamment, des ligands permettant aux leucocytes circulants de rouler (via E-, P-sélectine) et d'adhérer à l'endothélium via *InterCellular Adhesion*

Molécule- (ICAM) -1, -2 ; *Vascular Cell Adhesion Molecule* (VCAM) -1 puis de transmigration au travers de cet endothélium via leurs interactions notamment avec *Platelet and Endothelial Cell Adhesion Molecule 1* (PECAM-1/CD31), CD99 et *Endothelial cell-Selective Adhesion Molecule* (ESAM) et certaines *Junctional Adhesion Molecules* (JAMs) afin d'infiltrer les tissus [178], [179]. Les leucocytes possèdent les ligands à tous ces récepteurs endothéliaux [179]. Ainsi, les interactions entre la E-sélectine, la P-sélectine des cellules endothéliales et des glycoconjugués de surface des leucocytes sont impliquées dans le roulement des leucocytes sur l'endothélium. D'autre part, les intégrines  $\beta 2$  portées par les leucocytes *lymphocyte function-associated antigen-1* (LFA-1,  $\alpha L\beta 2$ ) et Mac-1 ( $\alpha M\beta 2$ ) ont, elles, des interactions fortes avec ICAM-1 endothéliale alors que l'intégrine *very late antigen-4* (VLA-4,  $\alpha 4\beta 1$ ) reconnaît VCAM-1, permettant aux leucocytes d'adhérer fermement à l'endothélium [180]. [180]. Au niveau des jonctions, lors de l'interaction des cellules endothéliales avec les leucocytes au cours de la transpédèse, une reconnaissance homophile entre PECAM-1/CD31 portées par les leucocytes et celles portées par les cellules endothéliales participe au passage des cellules immunes à travers l'endothélium. Il faut noter également que la phosphorylation du domaine intracellulaire de la VE-cadhérine participe à l'ouverture transitoire de la jonction inter-endothéliale et au passage des leucocytes lors de ce processus [181] (Figure 1-31) .

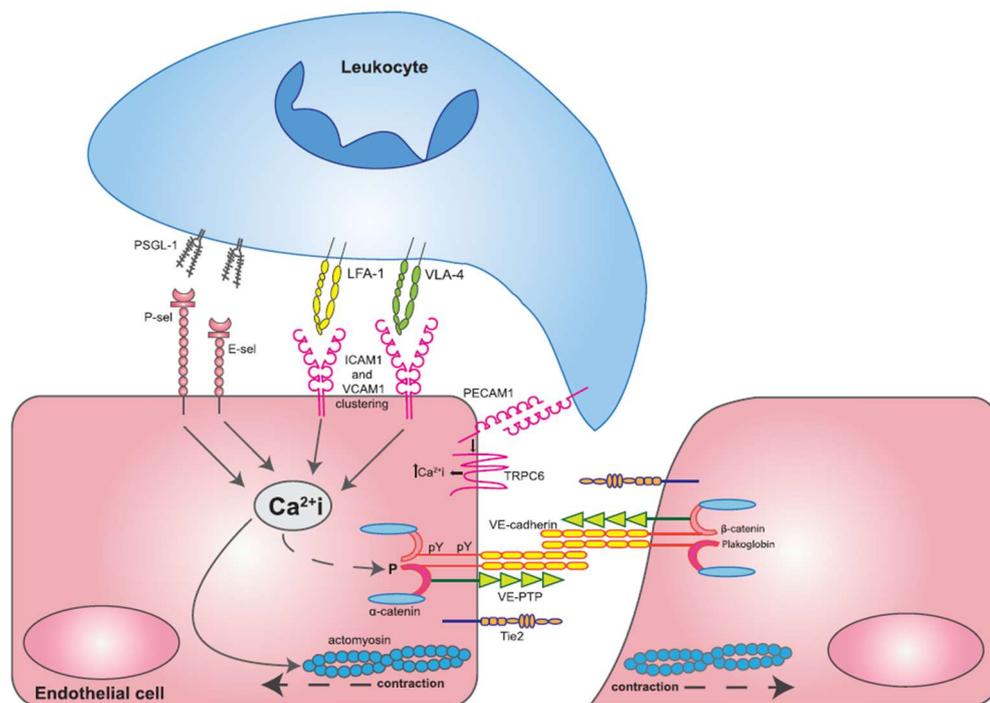


Figure 1-31 Mécanisme moléculaire du passage des leucocytes à travers la barrière endothéliale, adapté de [181]

L'activation de l'endothélium en conditions inflammatoires est vitale et sa régulation est cruciale. Une localisation excessive ou aberrante de l'activation endothéliale conduit à des troubles inflammatoires tels que l'athérosclérose, l'inflammation chronique, la sclérose en plaques et la polyarthrite rhumatoïde. Un défaut de cette activation favorise le développement tumoral [182].

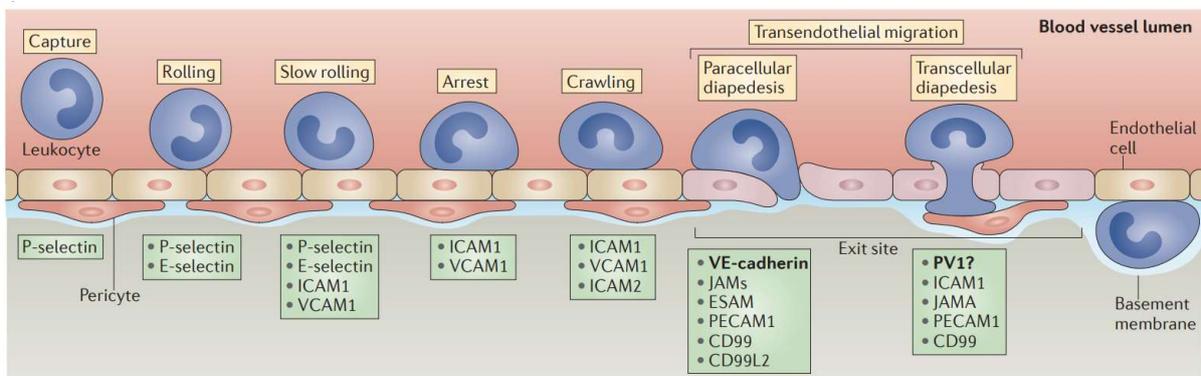
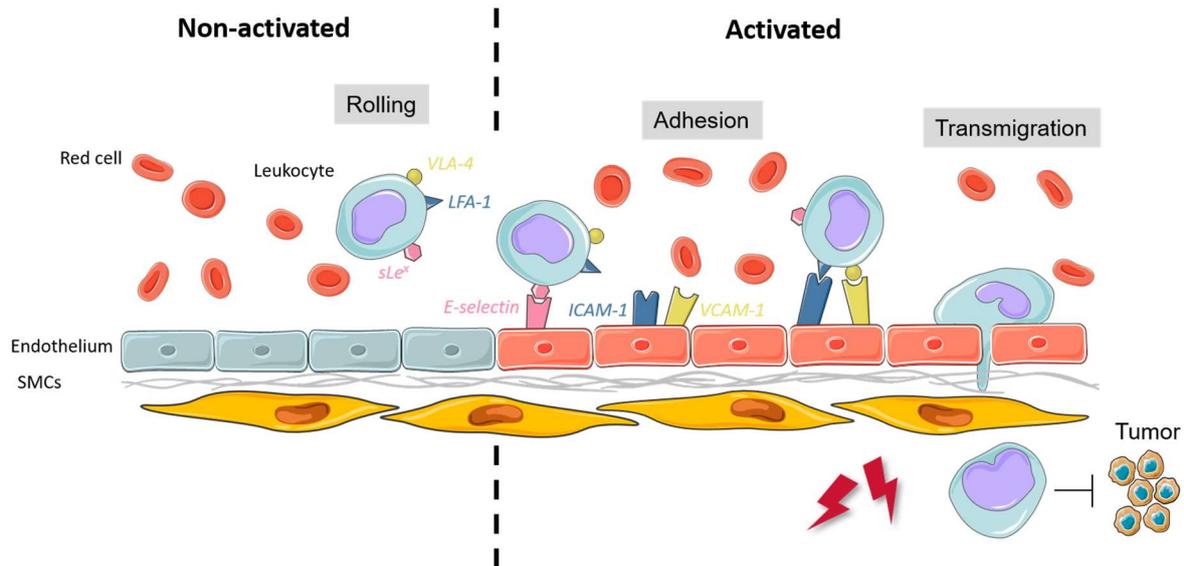


Figure 1-32 Etapes de l'extravasation des leucocytes, adapté de [183]

### 1.3.3.2 La perméabilité vasculaire

La perméabilité vasculaire est une autre fonction importante qui est due à la perturbation des jonctions serrées et adhérentes des endothéliales qui entraîne un relâchement de la barrière vasculaire et une fuite de fluides dans les tissus [171]. La perméabilité vasculaire est affectée dans plusieurs pathologies telles que l'inflammation, l'œdème et l'accident vasculaire cérébral ischémique [173], [184], [185]. Dans les cancers humains, la mauvaise qualité du réseau intra-tumoral avec, notamment, une perturbation des jonctions entre les cellules endothéliales, crée des brèches vasculaires et des vaisseaux fuyants [186]. Cette situation pourrait favoriser le passage de cellules cancéreuses métastatiques dans la circulation sanguine. De plus, l'endothélium des vaisseaux sanguins tumoraux, bien qu'imparfaitement constitué, protège activement les cellules tumorales de l'infiltration de cellules immunitaires cytotoxiques circulantes dans la masse tumorale par sa fonction barrière et par l'anergie induite par l'environnement tumoral [182], [187]–[189].

La perméabilité vasculaire est contrôlée par différents acteurs moléculaires. Le VEGF a été tout d'abord identifié sur sa fonction de vasoperméant (*vascular permeability factor*) et représente un facteur de perméabilité majeur pour le réseau vasculaire [190]. Par fixation au VEGFR-2, il déclenche l'activation de l'oncogène Src [191] et de la *focal adhesion kinase* [192], ce qui mène à la phosphorylation de la VE-cadhérine [193] sur plusieurs résidus [194] et à son [195], provoquant ainsi

la rupture de la jonction adhérente [196]. D'autres facteurs perméants vasculaires provoquent également la phosphorylation de la VE-cadhérine, comme l'histamine ou le TNF $\alpha$  [197], [198]. La thrombine est une protéase circulante impliquée dans la coagulation sanguine et qui convertit le fibrinogène soluble en fibrine insoluble [199]. C'est également un vasoperméant naturel puissant; un traitement de cellules endothéliales avec la thrombine modifie la distribution de la VE-cadhérine et son association à la  $\beta$ -caténine, perturbe les jonctions adhérentes et induit un relâchement des cellules endothéliales [200].

Dans ce travail, nous avons induit la perméation vasculaire en stimulant les vaisseaux sur puce avec de la thrombine, du TNF $\alpha$  ou de l'IL-1 qui sont des cytokines pro-inflammatoires également vasoperméantes [201].

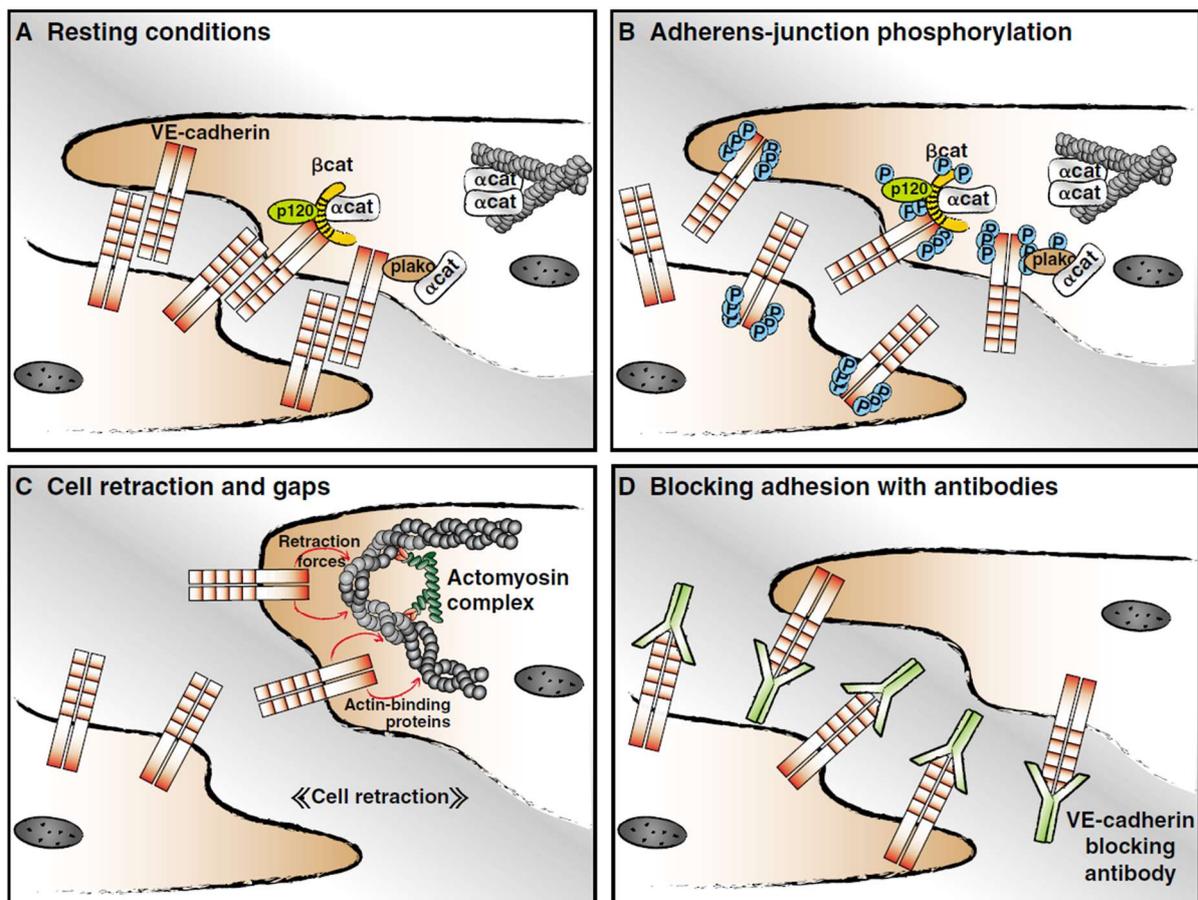


Figure 1-33 Comportement suggéré des jonctions adhérentes lors d'une augmentation de la perméabilité endothéliale, adapté de [202]

### 1.3.4 Modèles fonctionnels de vaisseaux sur puce

#### 1.3.4.1 Modèles d'activation vasculaire

Pour observer la réponse en activation des vaisseaux sur puce, différentes approches peuvent être mises en œuvre, notamment des tests d'adhérence de cellules immunitaires ou cancéreuses, une

analyse des surnageants de culture cellulaire et une analyse de l'expression de gènes des cellules endothéliales.

D'une part, la réponse de l'endothélium en activation peut s'évaluer de façon fonctionnelle. Une des méthodes couramment utilisées consiste à mesurer l'adhérence de cellules immunitaires sur l'endothélium. Ici, nous ne présenterons pas les nombreux modèles conçus particulièrement pour étudier l'extravasation de cellules à travers la barrière endothéliale, mais seulement les modèles qui ont utilisé cette propriété de l'endothélium comme outil de validation fonctionnelle. Le test d'adhérence consiste à stimuler ou non les vaisseaux sur puce avec un composé pro-inflammatoire, puis à injecter des cellules immunes ou cancéreuses marquées et enfin à dénombrer la quantité qui s'est accrochée à la surface de l'endothélium. Les modèles de vaisseaux sur puce qui ont mis en place cette validation ont utilisé des monocytes [30], [203], des lymphocytes T [204] et des neutrophiles [205], [206] (Figure 1-34). Dans la plupart des modèles, cette approche est mise en œuvre dans des conditions statiques, néanmoins il a été montré que la réalisation de ce test en flux réduisait sensiblement le nombre de cellules qui adhéraient à l'endothélium [205]. Un test similaire a été également réalisé en utilisant des particules fluorescentes recouvertes d'un anticorps dirigé contre le récepteur d'adhérence des leucocytes ICAM-1 à la place des cellules immunitaires [207].

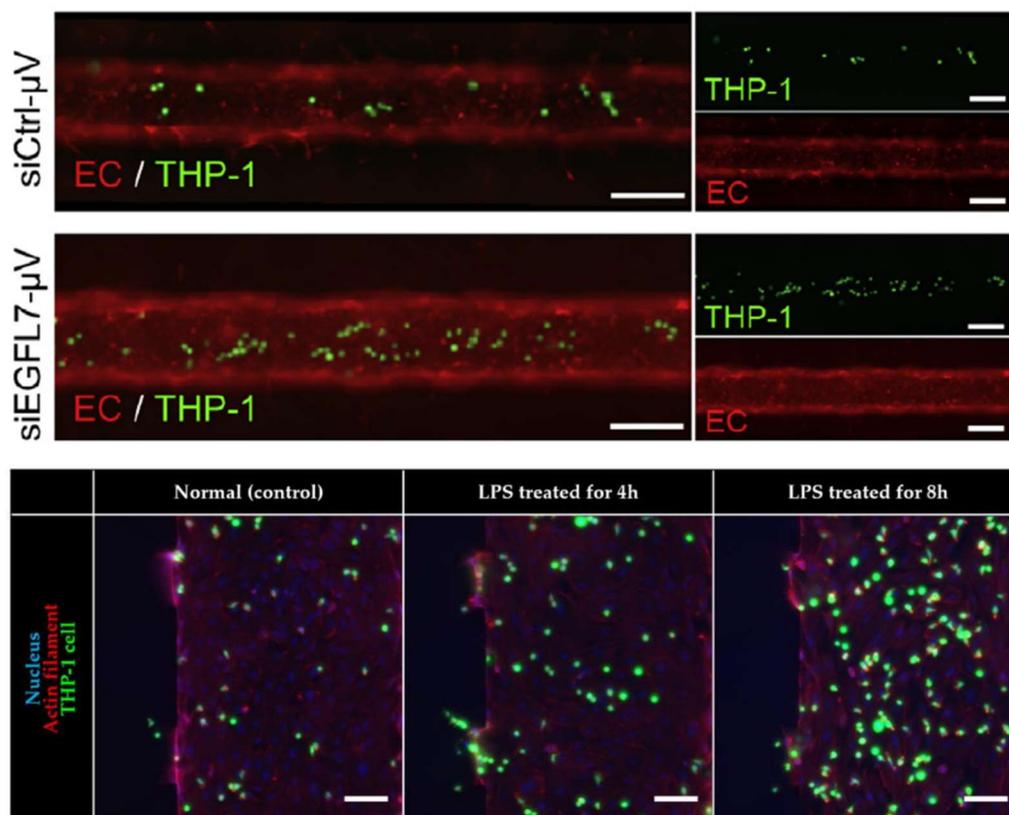


Figure 1-34 Adhérence de THP-1 dans des vaisseaux sur puce activé ou non, adapté de [203], [208]

D'autre part, la réponse en activation peut être évaluée au niveau moléculaire. Le surnageant de culture cellulaire peut être récupéré et analysé pour quantifier les protéines secrétées par les cellules [206]. L'expression d'ICAM-1 peut également être mesurée par immunofluorescence [203], [209] (Figure 1-35), l'analyse des niveaux d'expression de gènes connus pour être régulés dans les cellules endothéliales est également proposée [208].

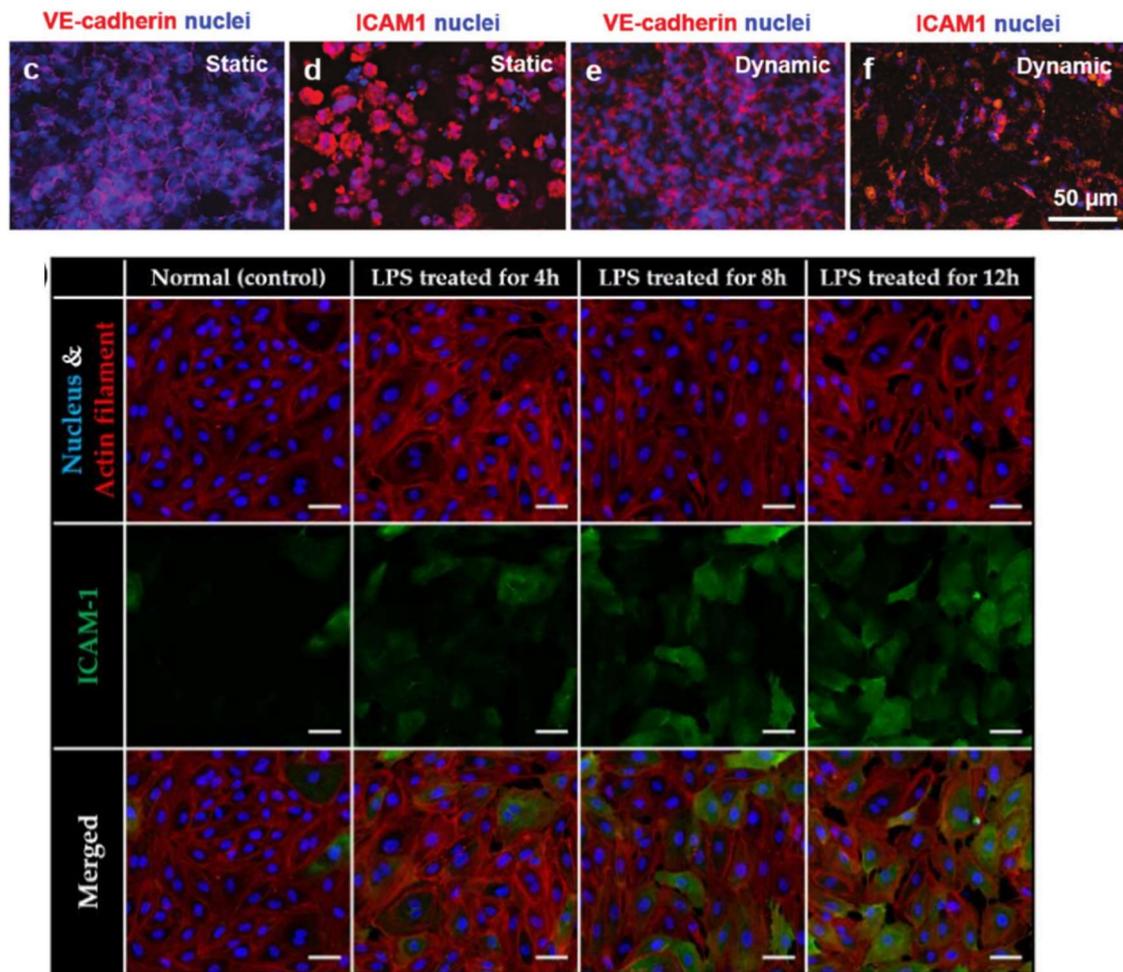


Figure 1-35 Evaluation de l'activation d'endothélie par immunomarquages d'ICAM-1, adapté de [203], [209]

Dans le cadre de ce travail nous avons quantifié la réponse fonctionnelle en activation des vaisseaux sur puce avec l'approche d'adhérence de cellules immunitaires et la réponse moléculaire via le dosage des niveaux d'expression de gènes des cellules endothéliales.

#### 1.3.4.2 Modèles de perméabilité vasculaire

La fonction de barrière d'un endothélium peut être affectée à cause d'un contexte pathologique ou par le biais de traitements médicamenteux par exemple. Il est essentiel de pouvoir évaluer cette réponse fonctionnelle quantitativement. Dans ce but, deux approches ont principalement été utilisées pour réaliser de telles mesures, la mesure de la résistance électrique transendothéliale ou *transendothelial electrical resistance* (TEER) et la mesure du transport paracellulaire par la diffusion de marqueurs moléculaires.

La mesure TEER est très répandue pour évaluer la qualité d'une barrière biologique, notamment avec l'approche utilisant des systèmes de membranes poreuses *transwell* ou équivalents. Elle consiste à appliquer un courant alternatif, c'est-à-dire un flux d'ions, à basse fréquence (typiquement 12.5Hz) à travers la couche endothéliale et à mesurer la différence de tension résultante pour en déduire la résistance électrique des jonctions. Pour cela, il est nécessaire de placer des électrodes de part et d'autre de la couche cellulaire [210] (Figure 1-36).

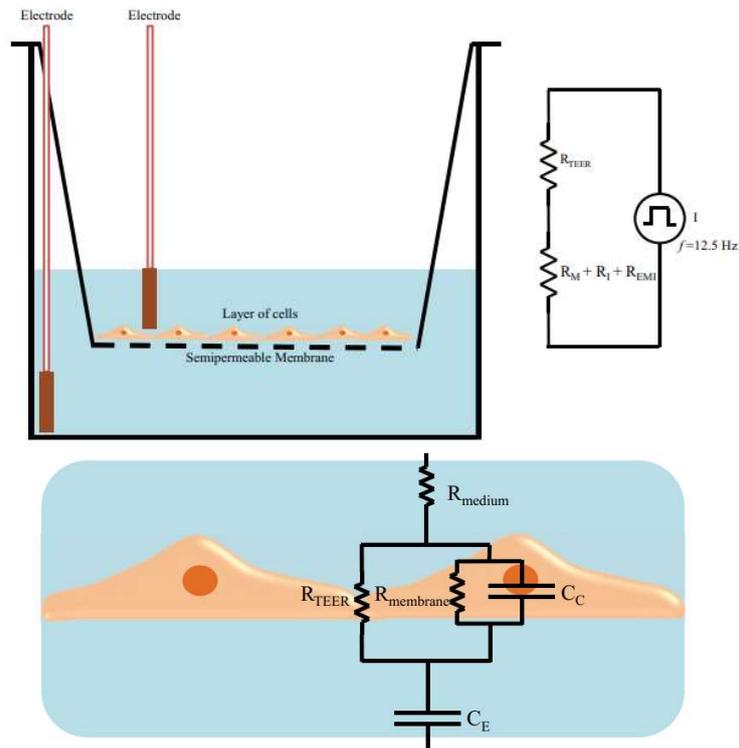


Figure 1-36 Principe de la mesure TEER en *transwell*, adapté de [210]

Cette technique de mesure est cependant très sensible à la position des électrodes et nécessite une densité de courant uniforme dans la couche cellulaire. Pour ces raisons, elle est plus difficile à mettre en œuvre dans une puce microfluidique puisqu'elle demande l'intégration d'électrodes dans les chambres de cultures pour être placées au plus près de la couche cellulaire. La majorité des modèles comportant des électrodes pour la mesure TEER sont des modèles de barrière hématoencéphalique. La configuration la plus répandue est composée de deux chambres fluidiques séparées par une membrane poreuse sur laquelle les cellules sont cultivées, des électrodes métalliques sont insérées dans chaque compartiment et la mesure de résistance est effectuée à travers les cellules et la membrane [79], [211], [212] (Figure 1-37). D'autres travaux ont également montré la possibilité de réaliser cette mesure sur une monocouche cellulaire cultivée directement sur une matrice en 2D [213] ou en 3D [214], [215] en plongeant les électrodes dans les ports d'entrée et de sortie de la puce microfluidique (Figure 1-37).

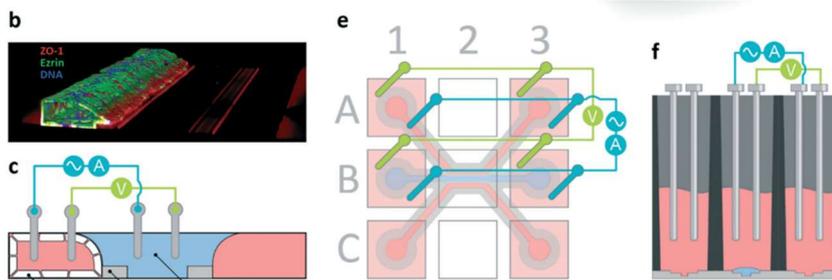
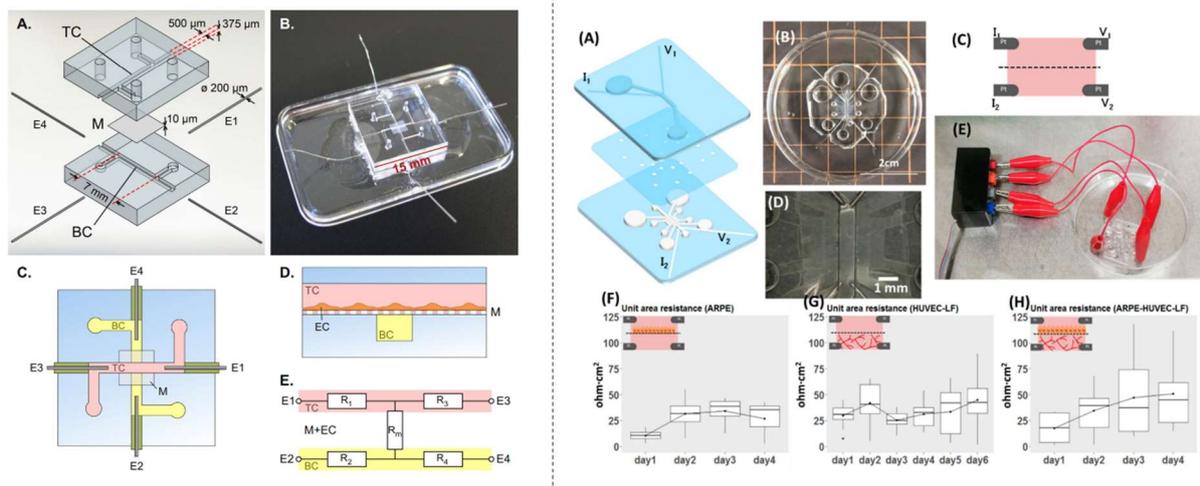


Figure 1-37 Mesure TEER à travers la couche cellulaire reposant sur une membrane poreuse (haut), adapté de [211], [212], à travers la couche cellulaire reposant sur un hydrogel (bas), adapté de [214]

Cependant, les mesures TEER dans un environnement microfluidique sont délicates. En effet, le faible volume de milieu rend sa résistance comparable à celle de la couche cellulaire et réduit la sensibilité de la mesure. Garantir une densité uniforme de courant est également difficile, pour cela les électrodes peuvent être étendues sur toute la longueur du canal mais elles gênent alors l'observation des cellules en microscopie. Le matériau choisi pour les électrodes doit, de plus, être bio compatible et ne pas se dégrader dans le temps. [216]

Une autre approche de mesure de la perméabilité est quantification de la diffusion de marqueurs moléculaires. Elle permet d'évaluer la perméabilité apparente d'un endothélium en mesurant le transport paracellulaire de composés de différents poids moléculaires. Cette méthode a été elle aussi développée à l'origine pour une mesure en configuration 2D dans des *transwells*, puis elle a été adaptée à une utilisation dans les microsystèmes. De nombreux modèles de vaisseaux sur puce s'appuient sur un traceur fluorescent comme le dextran-FITC (Figure 1-38) ou de l'albumine pour mesurer la diffusion, ceux-ci sont récapitulés dans le Tableau 1-7.

Tableau 1-7 Traceur fluorescents utilisés pour quantifier la diffusion.

Composé	Poids moléculaire	Référence
Dextran-FITC	3kDa	[32][215]
	10kDa	[217]
	40kDa	[218], [219]
	70kDa	[30], [80], [123], [220], [221]
	150kDa	[222]
	2MDa	[215]

Sodium fluorescéine	376Da	[213]
Albumin	66.5kDa	[5]

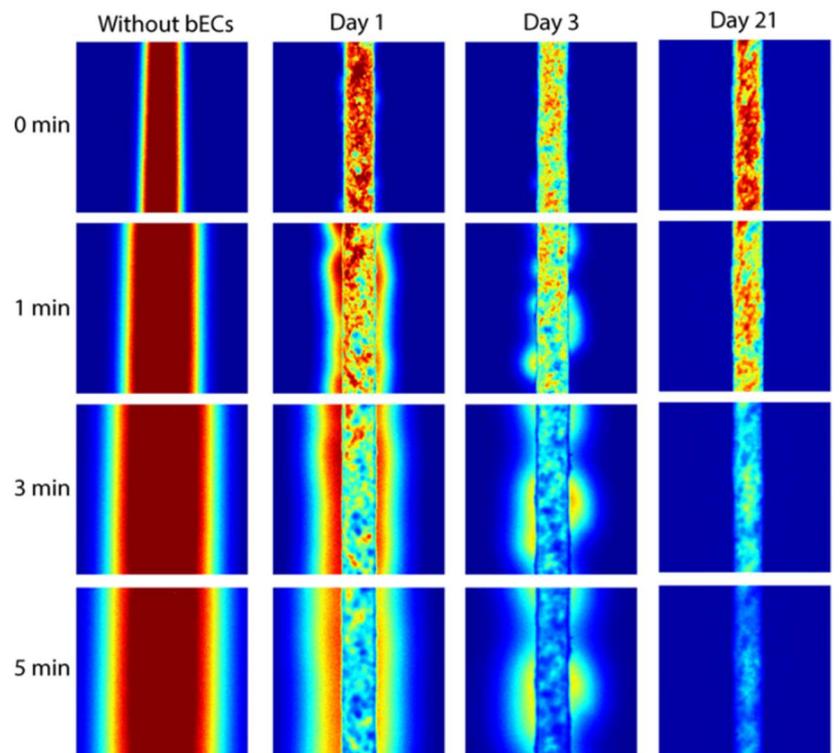


Figure 1-38 Diffusion de Dextran-FITC 40kDa au travers d'un vaisseau sur puce de cerveau selon la maturité de l'endothélium, adapté de [218]

Les molécules fluorescentes sont injectées dans la lumière des vaisseaux puis, la diffusion de ces traceurs est enregistrée par imagerie en utilisant un microscope à fluorescence. Le coefficient de perméabilité diffusives est ensuite calculé en suivant l'Équation 10 [216].

$$P_d = \frac{d}{4} \times \frac{1}{I_0} \left( \frac{\partial I(t)}{\partial t} \right)_0$$

Équation 10 :  $P_d$  : coefficient de perméabilité diffusives ;  $d$  : diamètre du vaisseau ;  $I_0$  : intensité moyenne dans la région du vaisseau ;  $I(t)$  : intensité moyenne dans la région de diffusion au cours du temps

La simplicité de mise en œuvre de cette approche fait qu'elle est la plus employée pour mesurer la perméabilité vasculaire des vaisseaux sur puce. Toutefois, ce genre d'approche ne peut pas être utilisée pour du suivi dans la durée de la perméabilité d'un même vaisseau, à moins de parvenir à rincer complètement les résidus de traceurs fluorescents entre deux mesures.

Ces deux approches fonctionnelles peuvent être complétées par une analyse moléculaire en visualisant les jonctions des cellules endothéliales par immunofluorescence (Figure 1-39). L'imagerie permet alors de visualiser les ruptures des jonctions adhérentes et serrées, ainsi que l'espacement des cellules.

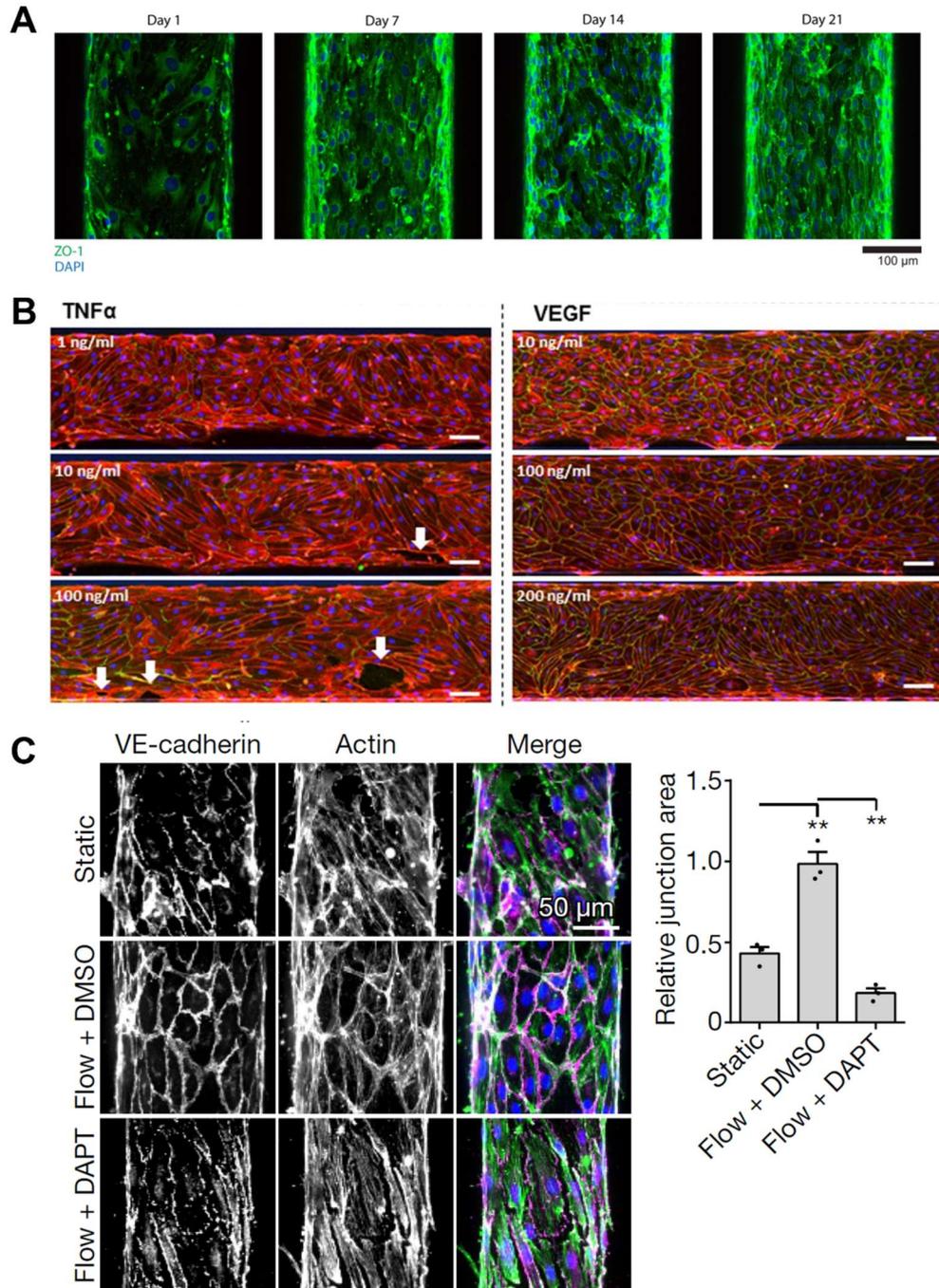


Figure 1-39 Exemples d'immunomarquages de vaisseaux sur puce pendant la maturation du vaisseau (A) ou après un traitement perméabilisant (B et C), adapté de [218], [222], [223]

Dans le cadre de ce travail, nous avons évalué la perméabilité des vaisseaux sur puce en mesurant la diffusion de Dextran-70kDa *via* vidéo-microscopie fluorescente et analyse d'image. Nous avons ensuite marqué leurs jonctions par immunofluorescence.

### 1.3.4.3 Intégration de cellules périvasculaires dans les modèles

Afin de recréer avec plus de complexité la structure des vaisseaux sanguins, des cellules périvasculaires ont été intégrées aux modèles de vaisseaux sur puce dans le but de mimer les péricytes ou les cellules musculaires lisses naturelles. Une approche intéressante repose sur l'auto-assemblage

de cellules endothéliales en présence de cellules périvasculaires intégrées dans des hydrogels - généralement de la fibrine, un processus proche de la vasculogenèse naturelle [125]. D'autre part, parmi les approches visant à reconstituer les différentes couches cellulaires concentriques vasculaires, l'une d'elle consiste à mélanger des cellules périvasculaires à l'hydrogel entourant le canal tapissé de cellules endothéliales [80], [131]. Une autre méthode consiste à ensemercer des cellules stromales de moelle osseuse [217] ou des péricytes de cerveau [32] avant les cellules endothéliales sur la même surface d'hydrogel, résultant en une couche composite de cellules. Pour obtenir une structure concentrique, des aiguilles amovibles ont également été utilisées pour ensemercer séparément les cellules endothéliales et périvasculaires dans des structures en forme de tube, une méthode de fabrication assez efficace [58], [224] (Figure 1-40).

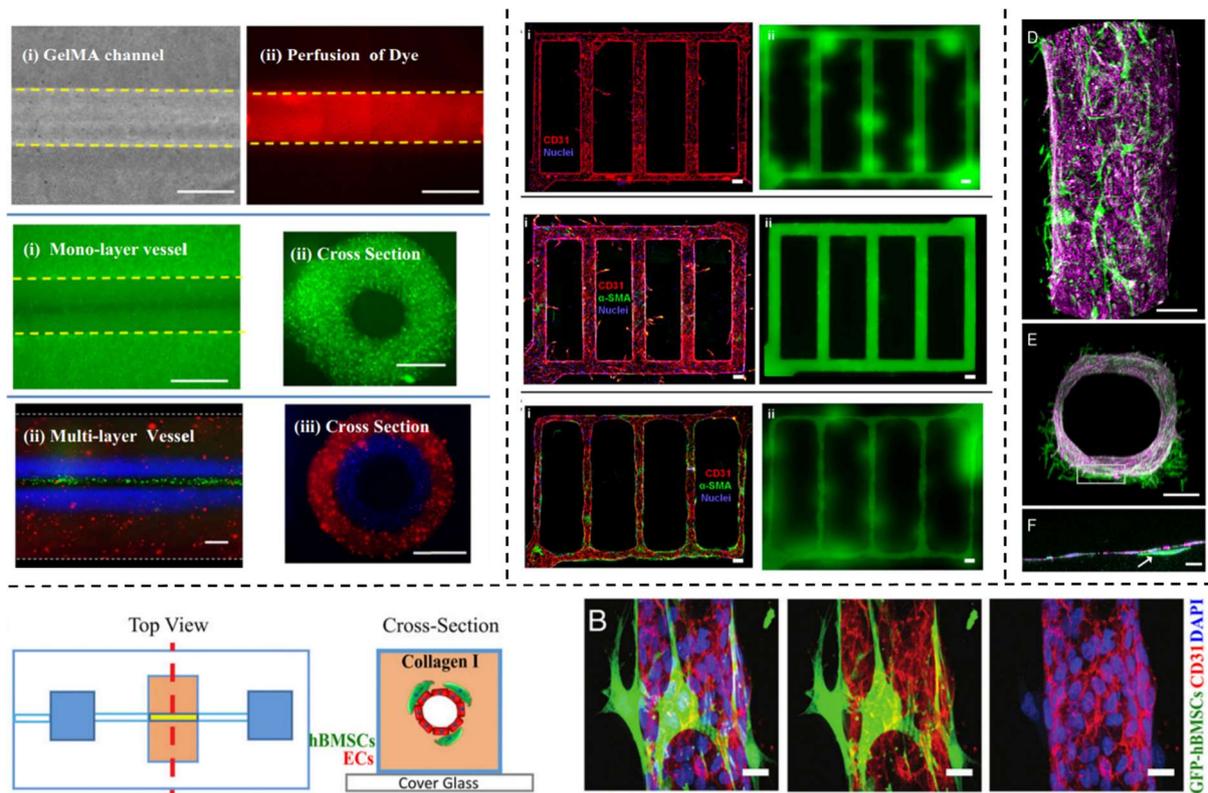


Figure 1-40 Exemple de vaisseaux sur puce composés d'une couche endothéliale et de péricytes, adapté de [32], [80], [217], [224].

Dans le cadre de ce travail nous avons choisi de fabriquer une multicouche cellulaire composée de cellules endothéliales et de fibroblastes de poumons pour mimer des péricytes.

## 1.4 CHALLENGE DE LA MONTEE EN ECHELLE

De nombreux modèles de vaisseaux sur puces sont parvenus à reproduire un contexte physiologique pertinent (morphologie, flux, multicouche cellulaires) et ont été développés pour étudier les réponses moléculaires et fonctionnelles d'endothélie dans des contextes pathologiques ou lorsqu'ils étaient soumis à un traitement. Ils représentent donc un outil versatile et complexe en termes de situations reproduites pour le criblage de médicament. Cependant, la plupart des dispositifs existants sont limités du point de vue de leur évolutivité et de leur standardisation [225]. Pour franchir

le cap de l'industrialisation, ces problématiques doivent être prises en compte dès la conception des vaisseaux sur puces.

Un effort récent a été fourni dans ce sens, afin de fournir des plateformes de vaisseaux sur puce plus facile d'utilisation et parallélisable. De telles plateformes ont été développées pour correspondre au format de plaques 96- ou 384-puits (Figure 1-41), pour des applications pour l'étude de la barrière hématoencéphalique [226], pour le criblage d'inhibiteurs de l'angiogenèse [227], de la perméabilité vasculaire [222], pour le criblage de molécules [75], pour l'étude de l'interaction endothélium-péricytes [228].

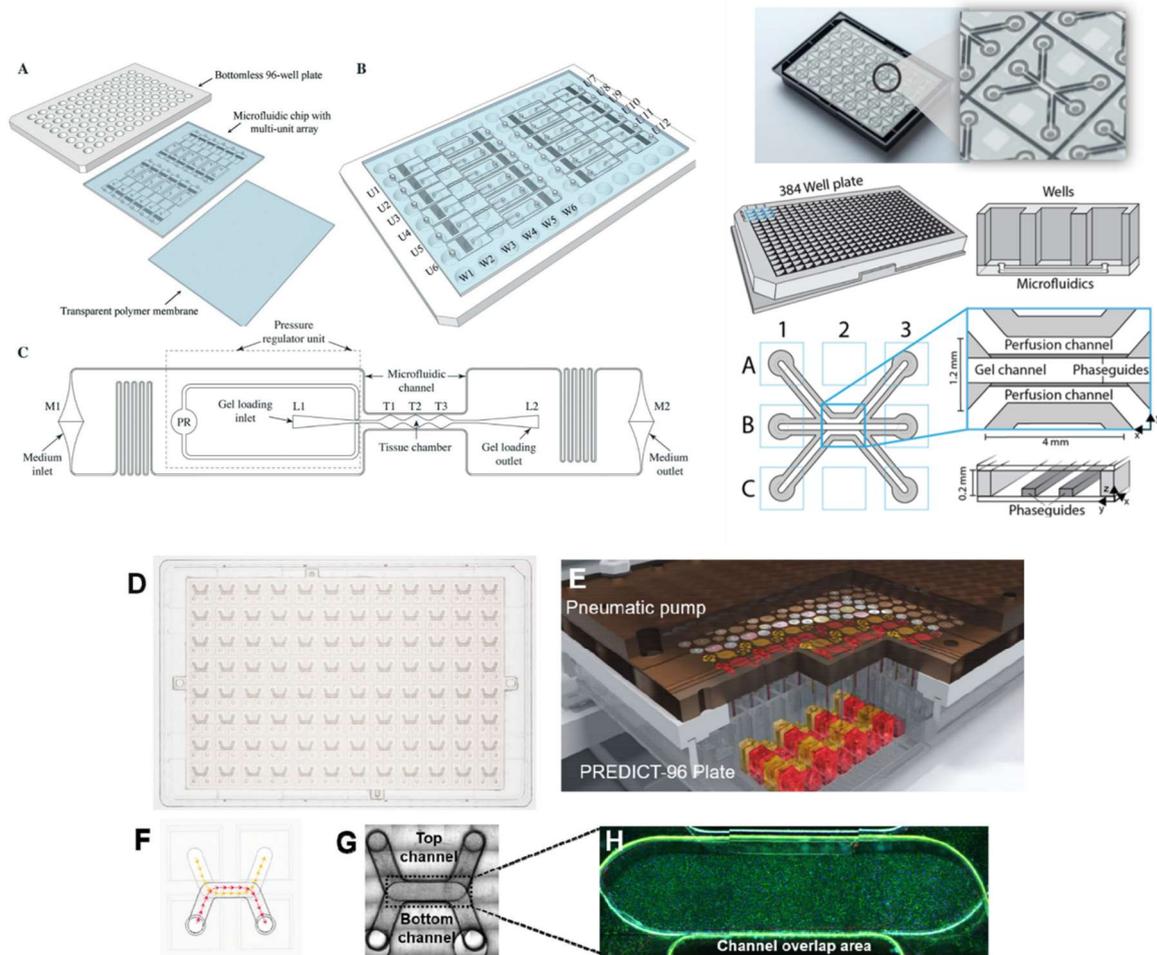


Figure 1-41 Exemples de parallélisation de vaisseaux sur puce en plaque multi-puits, adapté de [75], [227], [228]

Dans le cadre de ce travail, nous avons conçu les puces microfluidiques dans des dimensions compatibles avec le format d'une plaque 96-puit et nous avons choisi de mettre en œuvre des techniques de fabrication et de culture automatisable et potentiellement robotisables.



# *Chapitre 2 :*

## *Matériel et*

### *méthodes*



## 2.1 MICROFABRICATION

### 2.1.1 Moules en résine par photolithographie

Les moules en résine SU-8 ont été fabriqués à partir de substrats ou *wafers* de silicium (Siltronix Silicon Prime wafers CZ, diamètre:  $76.2 \pm 0.5$  mm, épaisseur:  $380 \pm 25$   $\mu\text{m}$ , orientation:  $\langle 100 \rangle$ , type dopage: P-Boron, résistivité: 1–20  $\Omega\cdot\text{cm}$ ). Une couche d'accroche d'hexamethyldisilazane (HMDS) a d'abord été déposée puis recouverte de résine SU-8 2050, 2075 ou 2100 (Micro Chem) par centrifugation (Figure 2-1) selon les paramètres donnés dans le Tableau 2-1 (recettes établies d'après les recommandations fabricant). La résine a ensuite été insolée selon un motif choisi sans masque physique avec un système d'exposition laser MLA150 (Heidelberg Instruments). La SU-8 a ensuite été développée avec du SU-8 developer (SU-8 DEV, Micro Chem), le *wafers* a été rincé et un recuit final a été réalisé.

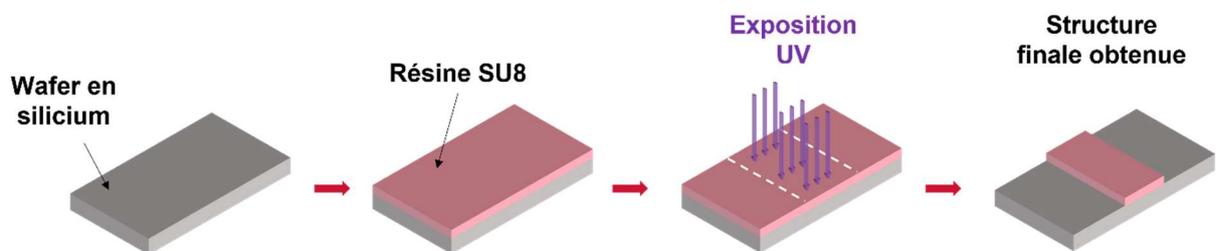


Figure 2-1 Etapes de fabrication du moule par photolithographie de résine SU-8

Tableau 2-1 Recettes suivies pour l'obtention du moule en fonction de la résine SU-8 utilisée et de la hauteur des canaux souhaitée.

SU-8 2075 - 90 $\mu\text{m}$	
Etape	Paramètres
Dépôt par centrifugation HMDS	Vitesse 1000 rpm
	Accélération 1000 rpm/s
	Temps 30s
Dépôt par centrifugation SU-8	Vitesse 500 rpm
	Accélération 500 rpm/s
	Temps 30s
Recuit doux	Vitesse 2000 rpm
	Accélération 500 rpm/s
	Temps 45s
Insolation Kloé	5 min à 65°C
	15 min à 95°C
Recuit post exposition	UV 365nm 100%
	3min à 65°C
Développement SU-8 DEV	8min
	20s (rinçage avec SU-8 DEV neuf)
	10s (IPA)
Recuit final	30min à 200°C

SU-8 2050 – 100µm	
Etape	Paramètres
Dépôt par centrifugation SU-8	Vitesse 500 rpm Accélération 100 rpm/s Temps 10s
	Vitesse 1600 rpm Accélération 300 rpm/s Temps 30s
Recuit doux	5 min à 65°C 15 min à 95°C
Insolation Heidelberg	UV 365nm, 240mJ/cm <sup>2</sup>
Recuit post exposition	5min à 65°C 10min à 95°C
Développement SU-8 DEV	8min (SU-8 DEV)
	20s (SU-8 DEV)
	10s (IPA)
Recuit final	30min à 200°C
SU-8 2100 - 200µm	
Etape	Paramètres
Dépôt par centrifugation HMDS	Vitesse 1000 rpm Accélération 1000 rpm/s Temps 30s
	Vitesse 500 rpm Accélération 100 rpm/s Temps 10s
Dépôt par centrifugation SU-8	Vitesse 3000 rpm Accélération 300 rpm/s Temps 30s
	5 min à 65°C 20 min à 95°C
Recuit doux	5 min à 65°C 20 min à 95°C
Insolation Heidelberg	UV 365nm, 250mJ/cm <sup>2</sup>
Recuit post exposition	5min à 65°C 10min à 95°C
Développement SU-8 DEV	12min
	20s (rinçage avec SU-8 DEV neuf)
	10s (IPA)
Recuit final	30min à 200°C

### 2.1.2 Moule en silicium par gravure à ions réactifs

Le moule en silicium a été fabriqué à partir d'un *wafer* de silicium (Siltronix Silicon Prime wafers CZ, diamètre :  $100 \pm 0.3$  mm, épaisseur:  $525 \pm 20$  µm, orientation: <100>, type dopage: P-Boron, résistivité: 1–10 Ω.cm). Le silicium a été localement gravé en protégeant certaines parties avec une résine négative AZ15nXT (MicroChemicals). La résine a été déposée par centrifugation selon les paramètres décrits dans le Tableau 2-2. Après recuit, insolation et développement le silicium a été gravé par le procédé Bosch dans un bâti de gravure ionique réactive profonde ou *deep reactive ion*

etching (DRIE), avec des étapes de passivation au C4F8 et de gravure au SF6. Après cette étape de gravure, une fine couche d'environ 100nm de revêtement de type « Téflon » a été déposée sur la surface du substrat de silicium à l'aide d'un plasma C4F8 pour faciliter le démoulage des puces.

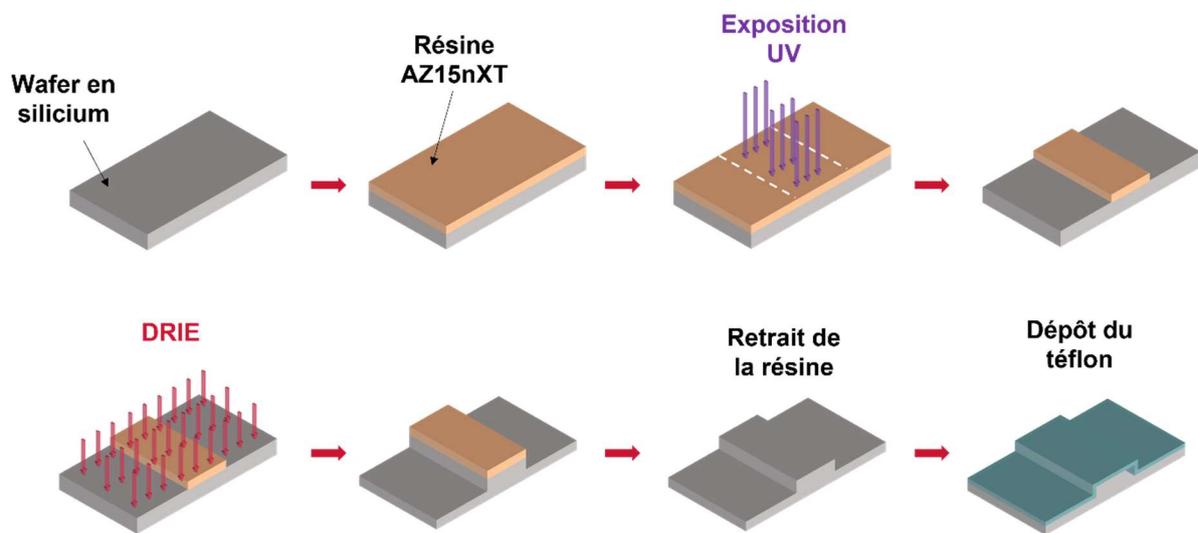


Figure 2-2 Etapes de fabrication du moule par gravure de silicium

Tableau 2-2 Recette suivie pour la gravure du moule en silicium

250µm	
Etape	Paramètres
HMDS dépôt par centrifugation (capot ouvert)	Vitesse 1500 rpm Accélération 1000 rpm/s Temps 45s
AZ15nXT dépôt par centrifugation (résine négative)	Vitesse 2500 rpm Accélération 1000 rpm/s Temps 30s
Recuit	110°C pdt 3min
Insolation Khloé	UV 365nm, 45s à 9mW/cm2
Recuit	120°C pdt 1min
Développement MIF 326	1min 45s
Densification	120°C pdt 1h
Gravure bâti (DRIE) STS System: Procédé Bosch	Step gravure/passivation 3/2,2 s C4F8: 100 sccm (passivation) SF6: 450 sccm (etching)  Puissance: Coil génération 13,56 MHz Gravure: 2500W Passivation: 1000W  Platen Generator: 45W  Vitesse de gravure 6,5um/min Sélectivité résine: 0,014 um/um gravé de si

### 2.1.3 Moule en aluminium au format SBS

Les canaux ont été conçus dans deux formats : h0.4mm x l0.4mm et h0.3mm x l1mm. La longueur des canaux a été fixée à 9mm pour correspondre à l'espacement entre les puits d'une plaque standard SBS 96-puits qui permet de réaliser 48 microcanaux indépendants. Les fichiers informatiques des plans du moule 3D (Autodesk Fusion 360 2020, v2.0.10440) ont été importés dans le logiciel de contrôle du Datron NEO machining center pour sa fabrication, cet équipement d'usinage numérique permet d'atteindre des résolutions en X, Y et Z de +/- 5µm. Les moules ont été usinés dans des plaques d'aluminium de 10mm d'épaisseur. Les dimensions ont ensuite été vérifiées par un comparateur mécanique sur un marbre et par imagerie optique pour la hauteur et la largeur des canaux respectivement.

### 2.1.4 Moulage du Polydiméthylsiloxane (PDMS)

Une solution de PDMS (Sylgard 184 Silicone Elastomer Kit, Dow chemicals, Ellsworth Adhesives France, Pontoise, France) a été reconstituée avec un ratio [monomère : agent réticulant] de [10:1], dégazée avec un mixeur à centrifugation planétaire ("THINKY MIXER" ARE-250) et versée délicatement sur le moule en veillant à ne pas créer de bulle (Figure 2-3). L'ensemble a alors été placé à 90°C pendant 2h pour réticuler thermiquement le PDMS. Les entrées et sorties fluidiques ont été ensuite perforées avec un emporte-pièce de biopsie (biopunch) de diamètre variable (1mm, 1.2mm, 1.5mm ou 2mm) . La plaque de PDMS a été finalement découpée aux dimensions des lamelles de verre (ThermoFisher Scientific, Illkirch, France) choisies selon les dimensions des canaux.

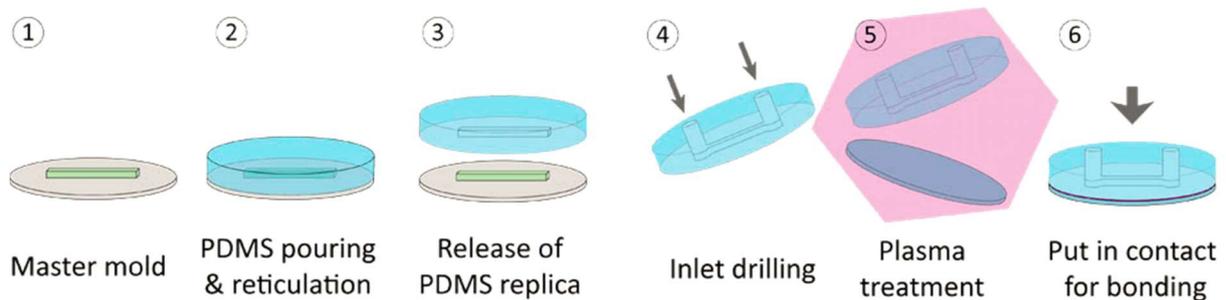


Figure 2-3 Processus de fabrication et d'assemblage des puces en PDMS , adaptée de elveflow.com

### 2.1.5 Assemblage des puces

Les lamelles de verre ainsi que les pièces de PDMS ont été rincées successivement dans de l'éthanol, de l'isopropanol et de l'eau déminéralisée puis délicatement séchées avec un flux d'azote. La surface de PDMS a été collée sur le verre grâce à une activation de surface par traitement plasma oxygène réalisée avec un Plasma cleaner (PDC-002, Harrick Plasma) pendant 10min sur les deux surfaces avant d'être pressées manuellement l'une contre l'autre. Une dernière étape de recuit à 95°C pendant 3h pour renforcer les liaisons entre le PDMS et le verre a été réalisée. Une fois refroidies, les puces ont été stockées dans des boîtes de Pétri stériles à température ambiante.

## 2.2 CULTURE CELLULAIRE

---

Les cellules endothéliales humaines primaires de veine ombilicale *Human Umbilical Vein Endothelial Cells* (HUVEC), les endothéliales microvasculaires pulmonaires *Human MicroVascular Endothelial Cells-Lung* (HMVEC-L) et les fibroblastes humains primaires *Normal Human Lung Fibroblasts* (NHLF) (Lonza, Verviers, Belgique) ont été cultivées respectivement dans de l'EGM-2, de l'EGM2-MV et du FGM-2 selon les instructions du fournisseur. Les monocytes THP-1 (ATCC, LGC Standards, Molsheim, France) ont été cultivés dans du milieu RPMI 1640 (Thermofisher Scientific, Illkirch, France), 10% de sérum de veau chauffé à 56°C pendant 20min (Hyclone, Fisher Scientific SAS, Illkirch, France), 1 mM pyruvate, 50 µM β-mercaptoethanol, 50U/ml pénicilline, 50µg/ml streptomycine. Les HUVEC et les NHLF ont été utilisées entre les passages 1 et 7, les HMVEC-L entre les passages 3 et 7. Toutes les cellules ont été cultivées dans des incubateurs saturés en humidité à 95% d'air et 5% de CO<sub>2</sub> à 37°C.

## 2.3 CREATIONS DES VAISSEaux PAR FOCALISATION

### HYDRODYNAMIQUE

---

Une solution de collagène neutralisée a été préparée en mélangeant une solution Cellmatrix Type I-A en acide acétique pH 3 (Fujifilm WAKO, Sobioda cat.no. W1W631-00651, Montbonnot St Martin, France), du tampon de Hank 10x et une solution neutralisante (NaHCO<sub>3</sub> 260 mM, HEPES 20 mM, 0.05 N NaOH) dans un rapport volumique de 8:1:1, sur glace. La solution de collagène a été placée dans 2 tubes 1.5 ml (500µl de solution par tube) qui servent de réservoir à pressuriser. Une solution de glucose neutralisée a été préparée en mélangeant une solution de glucose à 25% (D-glucose, Sigma, St. Quentin Fallavier, France), du tampon de Hank 10x et une solution neutralisante (NaHCO<sub>3</sub> 260 mM, HEPES 20 mM, 0.05 N NaOH) à un rapport volumique de 8:1:1, afin pour atteindre des concentrations similaires à la solution de collagène. Cette solution a été placée dans un tube de 15mL (10mL par tube) qui sert de réservoir à pressuriser. Les réservoirs ont été connectés à la puce de focalisation hydrodynamique *via* un assemblage de tubes semi-rigides en polytétrafluoroéthylène (PTFE, 0.3mm ID, 1.6mm OD, Adtech polymer engineering) et souples en silicone (0.5mm ID, 2.1mm OD, Thermo scientific, Illkirch, France) préalablement rincés à l'éthanol et à l'eau stérile. Un réservoir vide a également été placé en sortie de la puce (Figure 2-4). Un contrôleur de pression MFCS 7 bars (Fluigent, le Kremlin Bicêtre, France) contrôlé par le logiciel MAESFLO (Fluigent, le Kremlin Bicêtre, France) a été relié aux réservoirs *via* des capuchons de pressurisation P-CAP 2mL haute pression (Fluigent, le Kremlin Bicêtre, France).

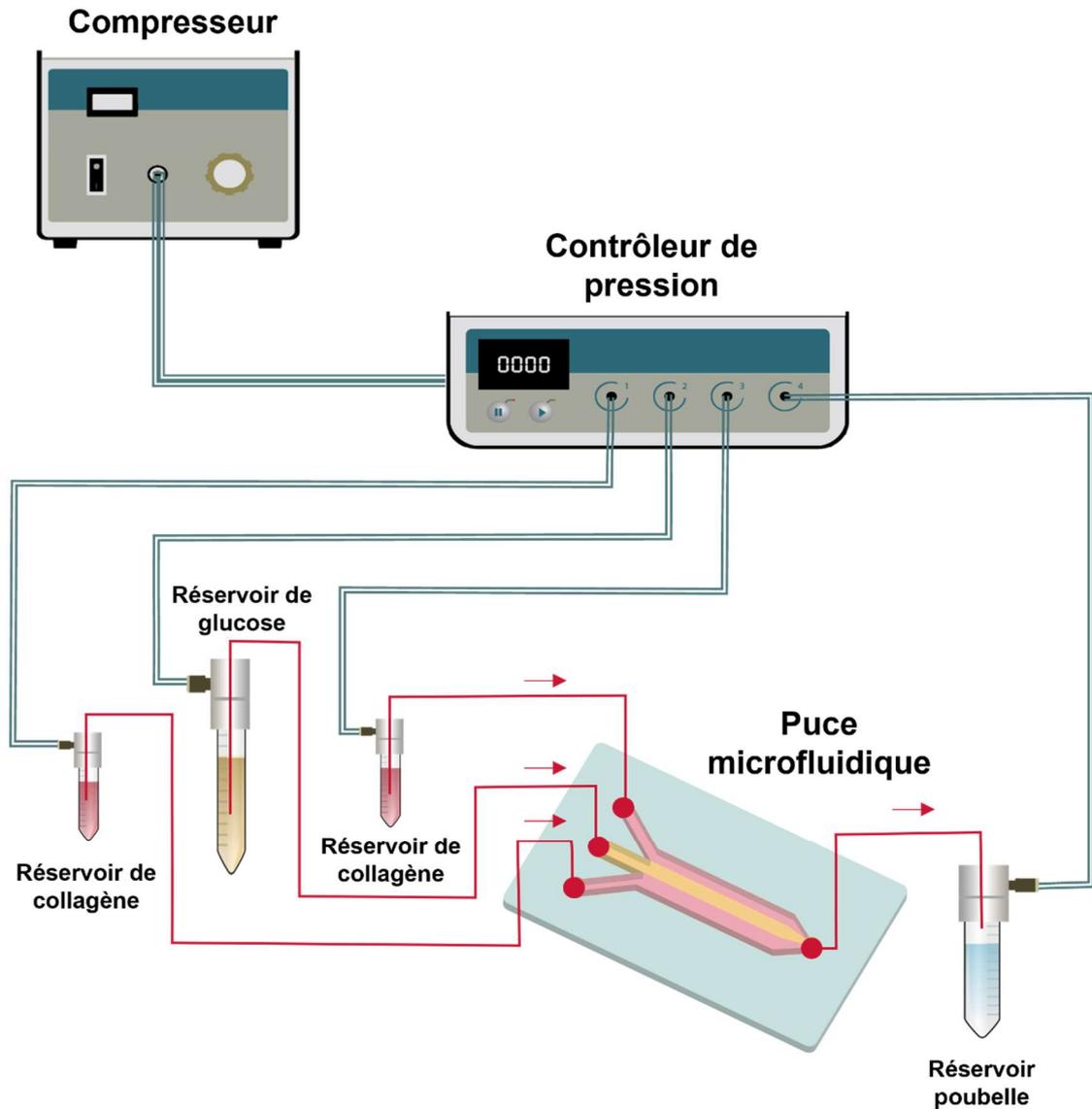


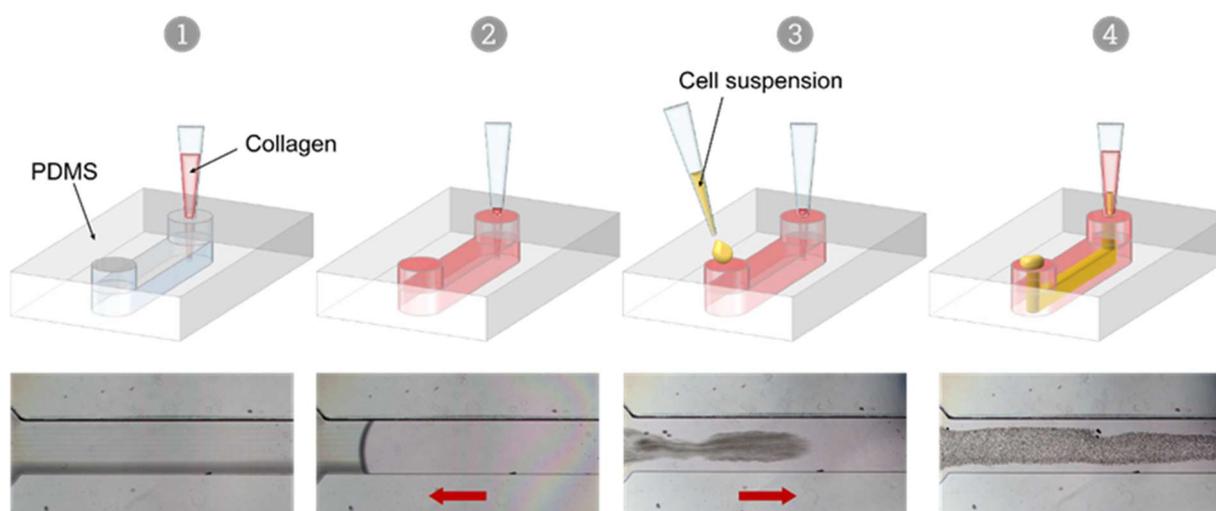
Figure 2-4 Montage expérimental pour la focalisation hydrodynamique de fibre de collagène

La taille des phases de collagène et de glucose a d'abord été équilibrée en faisant varier la pression autour de 250mbar sur chaque voie. A l'apparition des fibres de collagène, la pression des voies latérales a été augmentée à 1bar pour leur permettre d'avancer dans le canal microfluidique. Lorsque qu'une structure satisfaisante a été obtenue, la contre pression a été doucement augmentée en sortie pour figer les fibres. Les tuyaux d'entrées de la puce ont été pincés avec des clamps en plastique, puis la puce déconnectée des réservoirs.

Une seringue de 1mL a été connectée en sortie de la puce et a été utilisée en aspiration pour remplacer la solution de glucose par du milieu de culture EGM-2. Une suspension cellulaire d'HUVEC à 50 000 cellules/ $\mu$ L a été aspirée dans la puce *via* l'entrée fluïdique centrale par l'actionnement de la seringue en sortie de la puce. L'ensemble a ensuite été placé dans un incubateur pendant 24h saturé en humidité à 95% d'air et 5% de CO<sub>2</sub> à 37°C.

## 2.4 CREATION DES VAISSEAUX PAR *VISCOUS FINGER PATTERNING* (VFP)

Une solution de collagène neutralisé a été préparée en mélangeant une solution Cellmatrix Type I-A en acide acétique pH 3 (Fujifilm WAKO, Sobioda cat.no. W1W631-00651), du tampon de Hank 10x et une solution neutralisante ( $\text{NaHCO}_3$  260 mM, HEPES 20 mM, 0.05 N NaOH) dans un rapport volumique de 8:1:1, sur glace. Le VFP a été réalisé en remplissant les canaux avec 15  $\mu\text{l}$  de solution de collagène neutralisée par l'une des entrées et en laissant les cônes de pipette en place, puis en injectant 2 à 3  $\mu\text{l}$  de milieu de culture contenant ou non des HUVEC (30 000 cellules/ $\mu\text{l}$ ) dans l'ouverture fluide opposée (Figure 2-5). Les dispositifs ont été incubés à 37°C afin de permettre la gélification du collagène et l'adhérence cellulaire. Après 15 minutes, 20  $\mu\text{l}$  de milieu de culture ont été ajoutés à l'entrée et les pointes de pipettes ont été soigneusement retirées grâce à un léger mouvement de torsion. La procédure a éventuellement été effectuée une deuxième fois dans le cas d'un double VFP après avoir retiré le milieu des entrées.

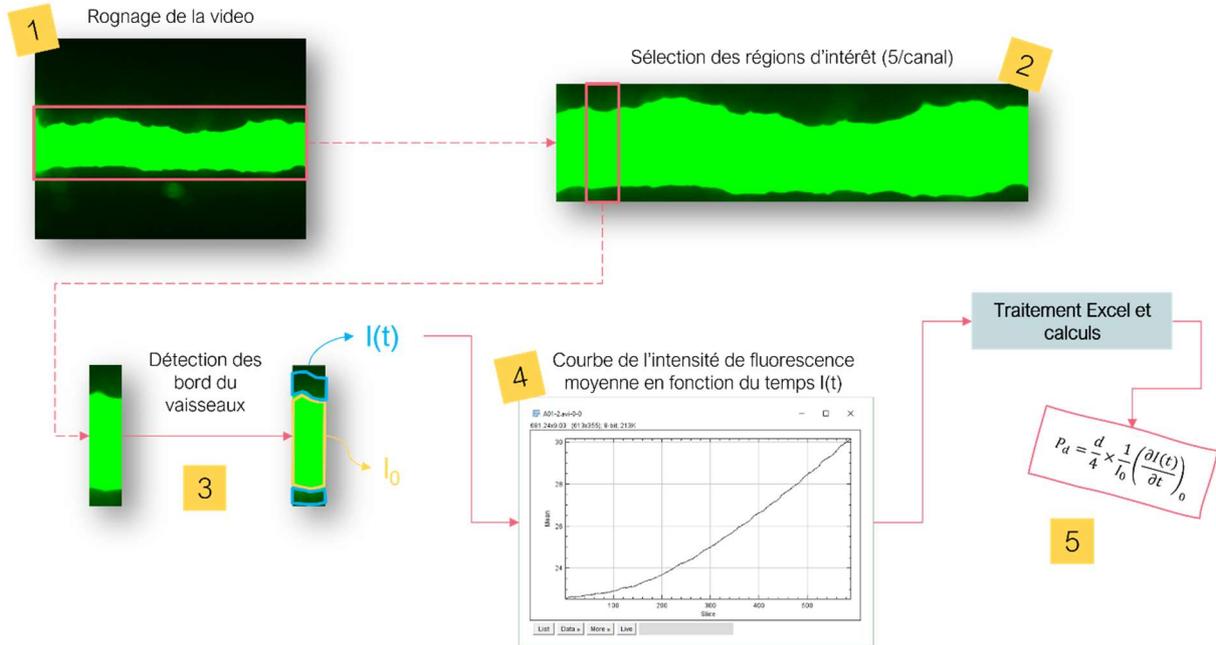


## 2.5 TEST DE PERMEABILITE

Les vaisseaux ont été stimulés avec 20  $\mu\text{L}$  de thrombine (T4393, Sigma-Aldrich, St. Quentin Fallavier, France) aux concentrations indiquées pendant 2-4h, puis 30  $\mu\text{L}$  de Dextran 70kDa-FITC 0.1mg/ml ont été injectés. La diffusion du Dextran a été enregistrée en vidéo fluorescence avec un microscope automatisé Keyence BZ-X710. Le coefficient de perméabilité par diffusion  $P_d$  a été calculé en mesurant la différence entre l'intensité moyenne de fluorescence dans le gel et dans la lumière du vaisseau au cours du temps. Pour obtenir des données quantitatives à partir des images de vidéo-microscopie, une macro Image J (FIJI software v1.53c [229]) a été créée, celle-ci permet de séparer les segments de l'image concernant le vaisseau ou le gel. Le coefficient de perméabilité par diffusion  $P_d$  a été ensuite calculé selon l'équation suivante :

$$P_d = \frac{d}{4} \times \frac{1}{I_0} \left( \frac{\partial I(t)}{\partial t} \right)_0$$

où  $d$  est le diamètre du vaisseaux,  $I_0$  est l'intensité moyenne dans la région du vaisseau et  $I(t)$  l'intensité moyenne dans la région du gel au cours du temps.



## 2.6 TEST DE REPONSE EN ACTIVATION

Les cellules endothéliales en 2D ou en vaisseaux sur puce ont été stimulées par incubation avec 10ng/ml de TNF $\alpha$ , IL-1 ou IL-6 pendant 4h en incubateur à 37°C en atmosphère saturée en humidité à 95% air/5% CO $_2$ . Des monocytes THP-1 (5-10 10 $^6$  cellules) dans leur milieu de culture ont été centrifugées à 200g pendant 5 min à température ambiante puis rincées en 5mL de milieu RPMI, centrifugées à nouveau dans les mêmes conditions puis reprises en RPMI à 5.10 $^6$  de cellules/mL. Les cellules ont ensuite été marquées en présence de 5 $\mu$ M de calcéïne-AM (Thermofisher Scientific, Illkirch, France) pendant 30 minutes à 37°C à l'obscurité, lavées deux fois avec 5mL de RPMI par centrifugation avant d'être mises à adhérer sur les HUVEC en 2D ou dans les vaisseaux sur puce en 3D. Les cellules ont ensuite été fixées 15min en PBS, 4% paraformaldéhyde à température ambiante, rincées et conservées en PBS à 4°C jusqu'à l'analyse.

## 2.7 IMMUNOFLUORESCENCE ET MICROSCOPIE

Les vaisseaux ont été rincés avec du tampon phosphate salin (PBS, Life technologies, Illkirch, France), puis fixés dans du PBS, 4% paraformaldéhyde (PFA, Santa-Cruz Biotechnologies, Heidelberg, Germany) pendant 90min à température ambiante. Ils ont été ensuite incubés en PBS, 5% albumine bovine sérique (BSA, Sigma-Aldrich, St. Quentin Fallavier, France) pendant 1h à température ambiante puis pendant 2h en présence d'anticorps primaire en PBS, 0.5% BSA, 0.3% Triton-X100 (Sigma-Merck,

St. Quentin Fallavier, France), rincés 3 fois 5min en PBS puis incubés en présence d'anticorps secondaire en PBS, 0.5% BSA, 0.3% Triton-X100 pendant 1h puis rincés comme précédemment. Les vaisseaux ont été post-fixés en PBS, 4% de paraformaldéhyde pendant 10min, rincés deux fois 5min en PBS et incubés en PBS, 1µg/ml DAPI pendant 10min à température ambiante, rincés deux fois 5min en PBS et enfin stockés à 4°C jusqu'à observation. Les anticorps primaires et autres réactifs utilisés sont listés dans le Tableau 2-3 :

Tableau 2-3 Liste des réactifs utilisés pour les immunomarquages

Antigène	Concentration	Référence et fournisseur
<b>Anticorps primaires</b>		
<b>vascular endothelial (VE)-cadhérine</b>	1:250	sc-9989 Santa-Cruz Biotechnologies, Clinisciences, Heidelberg, Germany
<b>vascular endothelial (VE)-cadhérine</b>	1:100	sc-6458 Santa-Cruz Biotechnologies, Clinisciences, Heidelberg, Germany
<b>α-actine de muscle lisse -FITC</b>	1:250	F3777, Sigma-Aldrich, St. Quentin Fallavier, France
<b>Zona Occludens-1</b>	1:250	617300, ThermoFisher scientific, Illkirch, France
<b>N-cadhérine</b>	1:250	AF6426, R&D, Minneapolis, USA
<b>Péricentrine</b>	1:250	Ab4448, Abcam, Paris, France
<b>Autres</b>		
<b>BODIPY Phalloïdine 558/568</b>	1:250	B-3475, ThermoFischer scientific, Illkirch, France
<b>DAPI</b>	1µg/ml	D9542-1MG, Sigma-Merck, St. Quentin Fallavier, France

Les images ont été prises avec un microscope confocal (Laser Scanning Microscope 880, LSM 880, Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) et traitées avec le logiciel d'édition ZEN 2 blue (Carl Zeiss). Les reconstructions 3D ont été générées grâce au module « 3D viewer » du logiciel FIJI v1.53c [230].

## 2.8 ANALYSE DE L'EXPRESSION DE GENES PAR RT-QPCR

Les vaisseaux ont été lysés individuellement avec 30µL de TRIzol (Thermofisher Scientific, Illkirch, France), les extraits cellulaires récupérés et les ARNs totaux purifiés par extraction au phénol/chloroforme et précipitation. La concentration des ARNs a été mesurée avec un NanodropOne (Thermofisher Scientific, Illkirch, France) et la réaction de transcription inverse réalisée à l'aide du kit « *High capacity cDNA reverse transcription kit with RNase inhibitor* » (Applied Biosystems, Thermofisher Scientific, Illkirch, France). La PCR quantitative a été réalisée en duplex, mélangeant le cDNA avec une sonde TaqMan marquée FAM du gène testé (Thermofisher Scientific, Illkirch, France) et une sonde β2-microglobuline marquée VIC dans une machine StepOne Plus. Alternativement, les cDNA (100ng) ont été analysés dans des cartes personnalisées *Taqman Array cards* (ThermoFisher Scientific, Illkirch, France) sur une machine QuantStudio7 Flex. Les valeurs C<sub>T</sub> ont été calculées après sélection des seuils sur la partie supérieure et linéaire de la courbe d'amplification logarithme-2 à l'aide du logiciel StepOne

v2.3. Les données sont exprimées en  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  où  $\Delta C_T = C_T$  du transcrit d'intérêt -  $C_T$  de référence ( $\beta 2$ -microglobuline) mesurés dans le même tube et  $\Delta\Delta C_T = \Delta C_T$  moyen échantillons expérimentaux -  $\Delta C_T$  moyen échantillons témoins de la même expérience. RQ (quantité relative) est  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  et transforme les données logarithmique-2 en valeurs décimales.

# *Chapitre 3 :*

# *Résultats*



## 3.1 ELABORATION D'UN MODELE DE BARRIERE ENDOTHELIALE EN PUCE MICROFLUIDIQUE

---

Grâce aux conclusions de l'étude bibliographique du chapitre d'introduction, nous avons défini les caractéristiques souhaitées pour notre modèle de vaisseaux sanguins sur puce : la nécessité d'établir un endothélium formant une interface lisse et continue entre la lumière du vaisseau et la matrice, un dispositif perfusable, un processus de fabrication automatisable et un design adaptable au haut débit. Ce chapitre présente les deux procédés développés au cours de ce travail pour créer une barrière endothéliale sur hydrogel en répondant au cahier des charges défini ci-dessus : la focalisation microfluidique hydrodynamique (*flow focusing*) et le modelage par digitation dans un fluide visqueux (*Viscous Finger Patterning, VFP*). Pour chaque procédé, nous nous intéressons à la facilité de mise en œuvre et à la reproductibilité, ainsi qu'à l'évolution de la conception géométrique des canaux microfluidiques. Cette partie explique également les difficultés rencontrées pour l'ensemencement des cellules endothéliales et les solutions apportées.

### 3.1.1 Technique de focalisation hydrodynamique

La focalisation hydrodynamique repose sur le fait que les écoulements au sein d'un canal microfluidique sont laminaires même lorsque le débit est élevé, les différents fluides injectés dans le canal restent dans des phases séparées et leurs échanges ne sont régis que par une diffusion limitée vis-à-vis de la longueur du canal [144], [231]. L'objectif ici a été de profiter de ce phénomène pour former une structure composée de deux phases d'hydrogel, qui constitueront la matrice d'adhérence des cellules endothéliales, séparées par une phase aqueuse qui formera la lumière du vaisseau.

Afin de mettre en mouvement les fluides au sein des puces microfluidiques, différentes configurations ont été comparées dans le but de choisir une instrumentation permettant d'obtenir des phases distinctes, régulières et stables dans le temps une fois le flux arrêté. Il était également nécessaire que le dispositif mis en place soit capable de mettre en mouvement des fluides visqueux puisque nous travaillions avec des hydrogels.

#### 3.1.1.1 Mise en place du procédé - essais initiaux

La première étape dans la mise en œuvre de la focalisation hydrodynamique a été de mettre en place la technique au laboratoire et de vérifier la possibilité d'obtenir des phases distinctes à partir de liquides hautement miscibles. Pour cela, nous avons élaboré une puce microfluidique à partir d'un dessin technique existant. Le moule a été fabriqué par gravure sur silicium par procédé Bosch, qui consiste à attaquer chimiquement le silicium pour le graver. La puce a été réalisée avec du PDMS assemblé sur une lame de verre. Le circuit fluidique était ainsi composé de trois entrées, d'une sortie et d'un canal principal mesurant  $2000\mu\text{m} \times 400\mu\text{m} \times 100\mu\text{m}$  (L x w x h) (Figure 3-1).

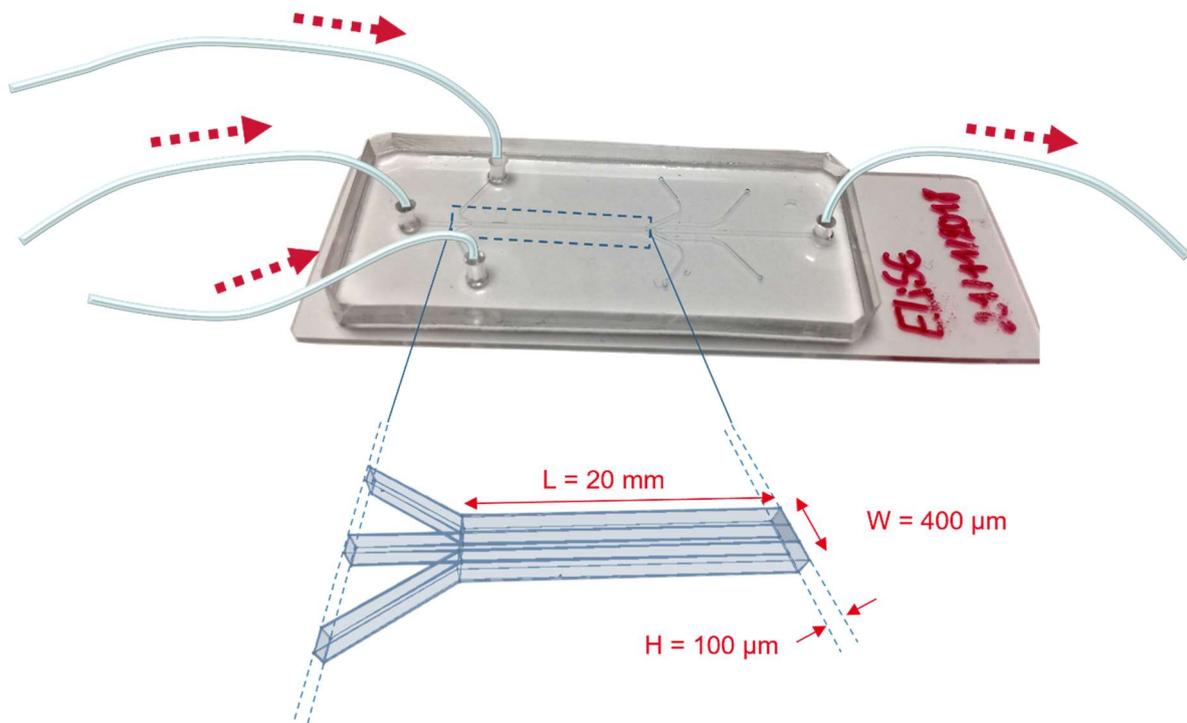


Figure 3-1 Connexions fluidiques et dimensions de la puce en PDMS

Afin de mettre au point la technique au laboratoire, différentes solutions d'eau additionnée de colorants alimentaires ont été injectées au sein de la puce microfluidique. Pour une bonne visualisation des phases, nous avons choisi un colorant bleu pour les entrées latérales et un colorant rouge pour l'entrée centrale. La mise en mouvement du flux a été tout d'abord effectuée en utilisant une simple seringue placée en sortie du dispositif, actionnée manuellement pour créer un effet d'aspiration des solutions placées dans des réservoirs d'entrée. La résistivité des différentes entrées étant supposée égale car de mêmes dimensions et la viscosité des solutions étant la même, il était attendu que des phases de largeurs équivalentes se forment au sein du canal principal de la puce. La Figure 3-2 illustre la phase centrale en rouge bien distincte des phases périphériques bleues. Les trois phases restent bien séparées et stables tant que la seringue est actionnée et que les fluides s'écoulent.

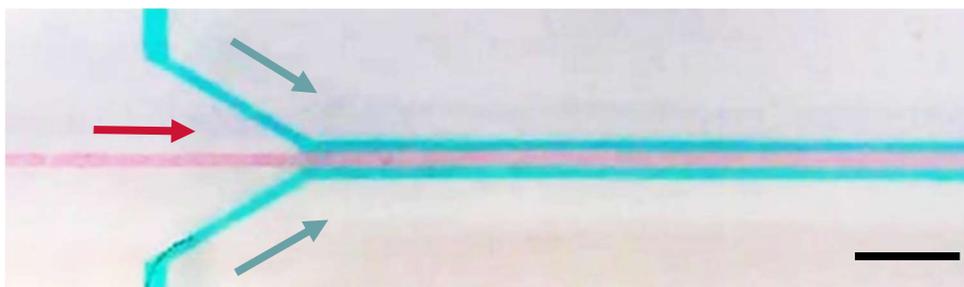


Figure 3-2 Focalisation de flux au sein d'une puce microfluidique par aspiration manuelle d'eaux colorées, barre = 1mm

Le système mis en place était donc fonctionnel et nous avons commencé les essais avec des hydrogels.

### 3.1.1.2 Focalisation hydrodynamique d'hydrogels

La mise au point de cette approche a été poursuivie en utilisant des hydrogels dans le but de former la base matricielle des futurs vaisseaux sanguins. Nous avons envisagé d'utiliser deux types d'hydrogels. L'un est une solution d'acide hyaluronique liquide (Biomimesys, HCS Pharma) qui peut être manipulée comme un fluide visqueux et qui nécessite ensuite une congélation puis une lyophilisation pour former la matrice finale. L'autre hydrogel utilisé est une solution de collagène de type I qui gélifie à température ambiante et à pH neutre. Dans les deux cas, la solution initiale d'hydrogel est beaucoup plus visqueuse que l'eau utilisée pour les tests précédents.

#### 3.1.1.2.1 Focalisation hydrodynamique avec la matrice Biomimesys

Une solution de Biomimesys colorée en bleu a été injectée dans les entrées latérales de la puce microfluidique et de l'eau distillée dans la voie centrale. La Figure 3-3 montre trois phases liquides bien distinctes à l'entrée du canal central. Cependant, plus les phases ont progressé dans le canal, plus la phase aqueuse s'est élargie, jusqu'à occuper toute la largeur du canal. Ceci s'explique probablement par le fait que la solution d'hydrogel était beaucoup plus visqueuse (environ 100mPa.s) que l'eau (1 mPa.s, 20°C, 1bar) et demandait donc une différence de pression plus élevée pour être mise en mouvement en comparaison à la solution aqueuse.

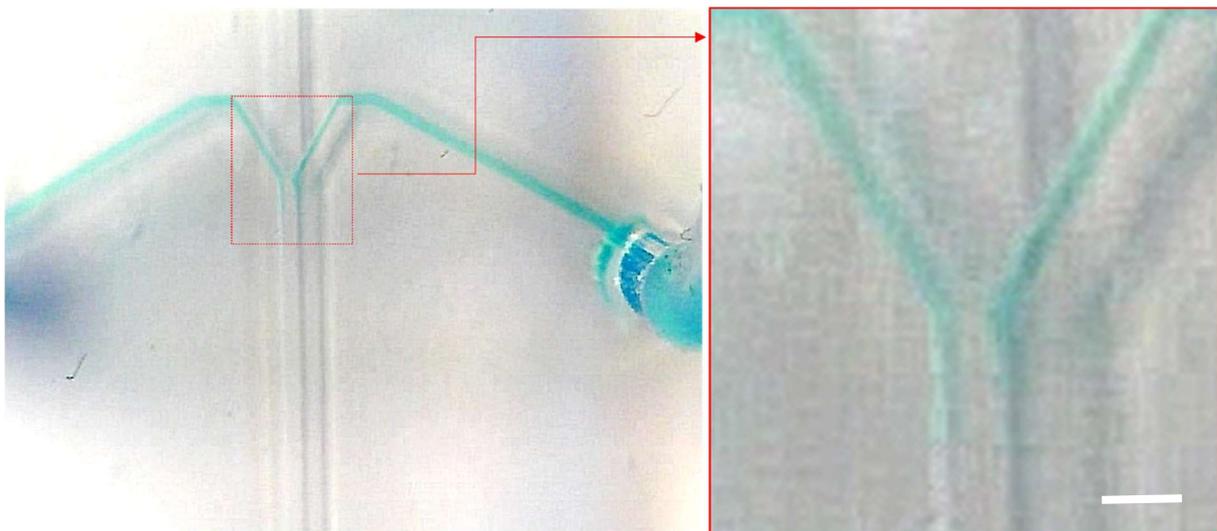


Figure 3-3 Focalisation hydrodynamique avec un hydrogel visqueux (bleu) et une solution aqueuse au sein d'une puce microfluidique par aspiration manuelle, barre= 400µm

Le flux étant généré par aspiration en sortie de la puce, il était impossible dans ces conditions de contrôler les flux d'entrée de chaque solution individuellement. La phase aqueuse moins visqueuse prenait logiquement toute la largeur du canal au cours du procédé. Une solution envisagée a été alors, d'une part, d'utiliser un fluide de viscosité similaire à l'hydrogel utilisé (huile de silicone) pour remplacer l'eau dans la voie centrale. D'autre part et étant donné que la différence de pression générée par une seringue est directement liée et limitée par sa géométrie, nous avons choisi d'utiliser une puce microfluidique commerciale présentant moins de résistivité fluidique, c'est-à-dire avec des canaux plus larges. Cela nous a également évité de relancer une fabrication coûteuse et chronophage d'un moule avec des nouvelles dimensions à cette étape de preuve de principe.

### 3.1.1.2.2 Amélioration du dispositif technique

Pour ces essais, un pousse-seringue connecté à une puce microfluidique commerciale Ibidi ( $\mu$ -Slide III 3in1 cat. no: 80316) en polymère composée de trois entrées, une sortie et d'un canal principal mesurant  $2000\mu\text{m} \times 3000\mu\text{m} \times 400\mu\text{m}$  (L x w x h) ont été utilisés. Les voies latérales de la puce ont été connectées à un réservoir d'hydrogel coloré en bleu ou en rouge (Biomimesys) et la voie centrale a été connectée à un réservoir d'huile de silicone AP100 (Sigma-Aldrich, St. Quentin Fallavier, France, viscosité d'environ 100 mPa.s, donnée fabricant). Dans des conditions d'aspiration et avec un débit programmé de 50mL/h, on a bien obtenu 3 phases distinctes, comme attendu (Figure 3-4 A).

Puisque l'hydrogel Biomimesys a besoin d'être congelé pour être transformé en sa forme *hydro scaffold* finale, il était nécessaire de déconnecter la puce après la formation des phases pour finaliser le processus de fabrication de la matrice. Il était donc impératif que la séparation des trois phases soit conservée à l'arrêt des flux. Lorsque le débit a été progressivement diminué à 40mL/h, les phases sont devenues légèrement perturbées et moins rectilignes mais elles sont cependant restées bien distinctes (Figure 3-4 B) A l'arrêt total du flux, les phases sont restées légèrement distordues mais globalement bien séparées et stables (Figure 3-4 C).

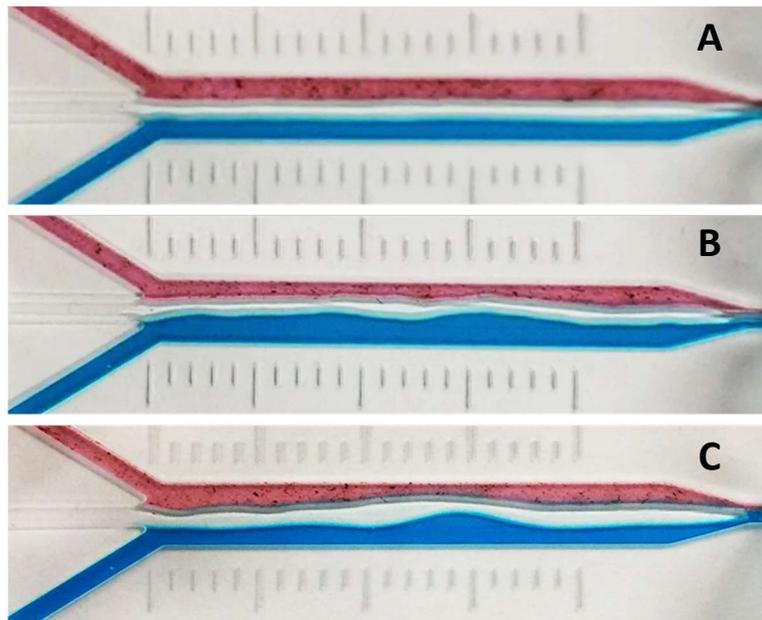


Figure 3-4 Focalisation hydrodynamique d'un hydrogel visqueux (bleu et rouge) et d'une huile de silicone, une graduation = 1mm

Après une amélioration supplémentaire des conditions d'arrêt du flux par clamping, cette approche a permis de conserver trois phases régulières et bien distinctement séparées (Figure 3-5 A) même après déconnexion de la puce (Figure 3-5 B)

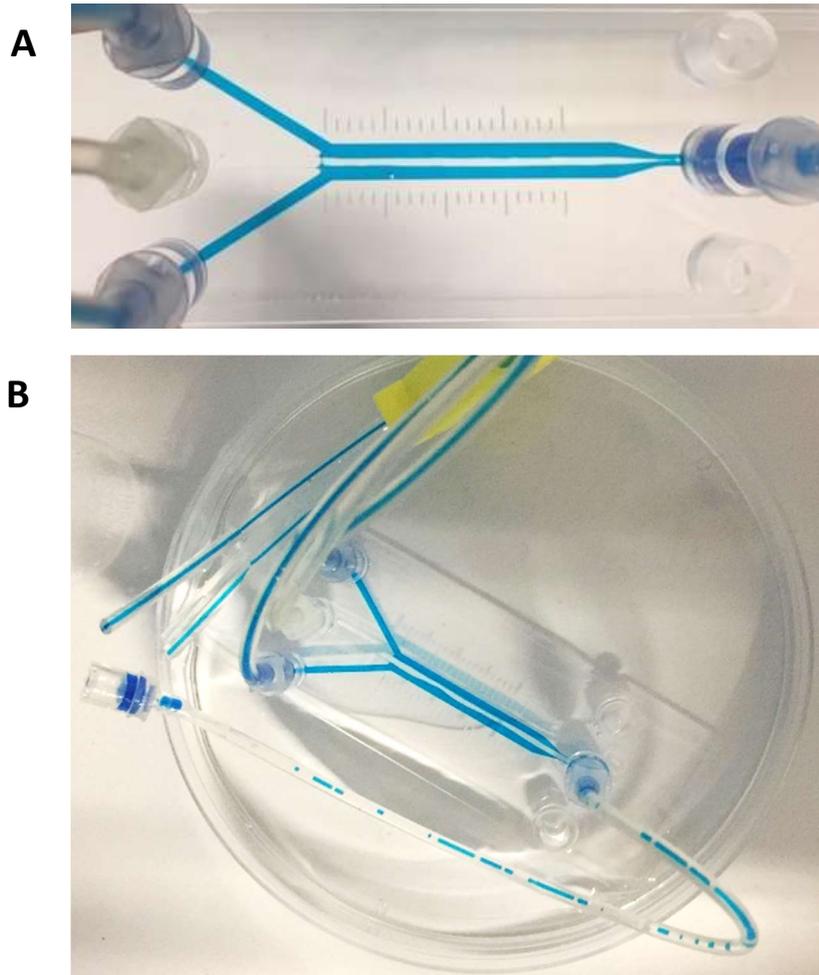


Figure 3-5 Structure triphasée obtenue par focalisation hydrodynamique d'un hydrogel visqueux (bleu) et d'une huile de silicone avant arrêt du flux (A) et après l'arrête du flux (B), une graduation = 1mm

Une fois la puce déconnectée, les étapes de congélation et de lyophilisation de l'hydrogel Biomimesys pour lui donner sa forme finale ont pu être réalisées directement dans la puce où la distinction entre les deux phases de matrice et le canal central d'un futur vaisseau était bien visible (Figure 3-6).

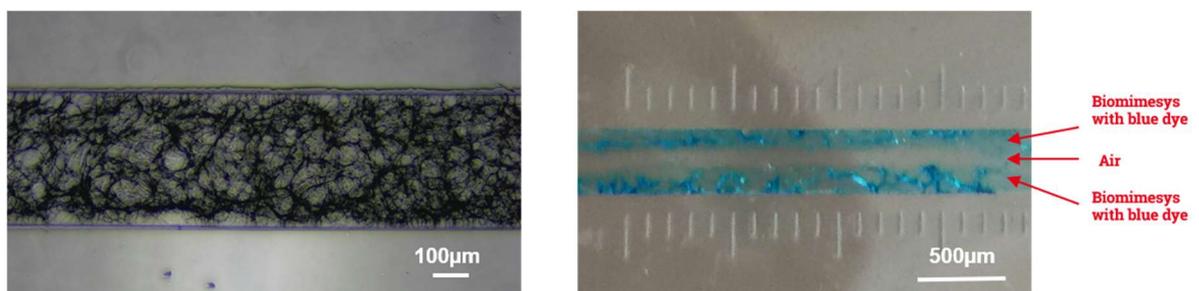


Figure 3-6 Matrice Biomimesys après la finalisation de son processus de fabrication au sein d'une puce microfluidique en canal simple (gauche) et après le procédé de focalisation hydrodynamique (droite).

Cette approche de focalisation hydrodynamique et l'instrumentation mise en œuvre nous ont ainsi permis de déposer de façon satisfaisante l'hydrogel sur les parties latérales du canal central de la puce microfluidique et de créer un lumen où ensemercer des cellules endothéliales par la suite.

Afin de vérifier la compatibilité de l'hydrogel Biomimesys avec l'établissement d'une monocouche et la culture des cellules endothéliales, nous avons ensuite ensemercé des HUVEC à différentes densités dans une plaque 96-puits préalablement remplie de Biomimesys sous sa forme finale, c'est à dire une structure lyophilisée macroporeuse (*hydroscaffold*) d'acide hyaluronique. La visualisation des cellules par imagerie à contraste de phase étant impossible à cause des fibres de Biomimesys, nous avons réalisé un marquage nucléaire pour observer la répartition des cellules endothéliales après 24h par fluorescence. Dans toutes les conditions testées, l'*hydroscaffold* était malheureusement trop poreux (porosité=200µm, donnée fabricant), les cellules endothéliales ne se sont pas étalées, elles sont entrées dans l'épaisseur de la matrice et ont formé des grappes (Figure 3-7). L'hydrogel Biomimesys n'a donc pas permis l'établissement d'une monocouche endothéliale.

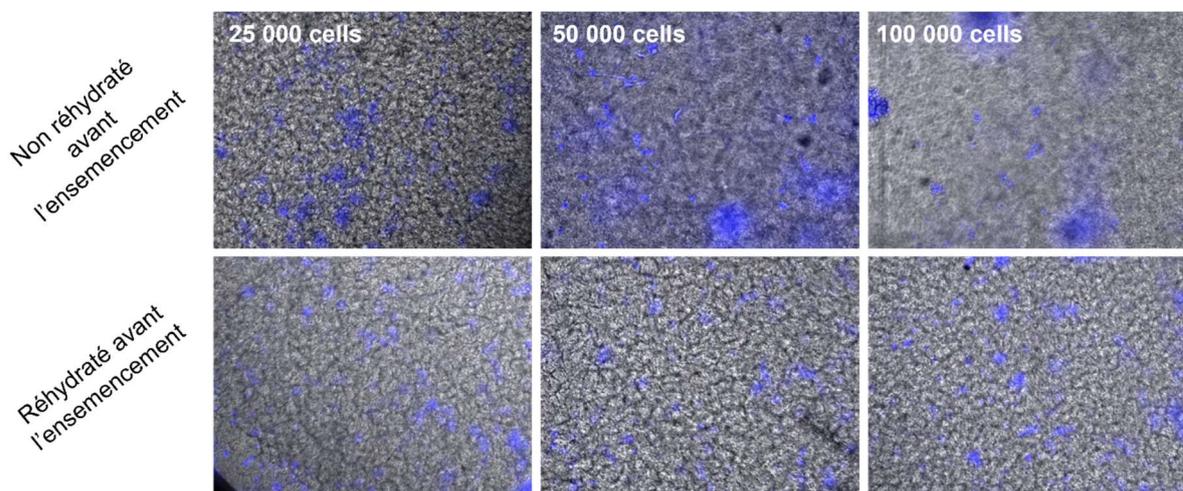


Figure 3-7 Ensemencement de cellules endothéliales dans l'*hydroscaffold* Biomimesys, bleu = DAPI, contraste de phase = fibre de biomimesys.

Pour contrecarrer le problème de porosité qui empêchait l'établissement d'une monocouche, la matrice lyophilisée de Biomimesys a été remplie avec un hydrogel, soit du Biomimesys sous forme liquide, soit une solution de collagène de type I. Ces hydrogels ont été introduits préalablement à l'ensemencement des HUVEC dans la matrice lyophilisée Biomimesys. Dans le cas du Biomimesys liquide, les cellules endothéliales ne se sont pas étalées et ont à nouveau formé des grappes (Figure 3-8). Lorsque que la matrice Biomimesys a été remplie de collagène, les cellules ont semblé former une monocouche à sa surface.



Figure 3-8 Ensemencement de cellules endothéliales dans l'*hydrosccaffold* Biomimesys avec différents matériaux de remplissage

Même si cette approche a pu sembler intéressante, la matrice Biomimesys avait des qualités optiques très contraignantes qui ne permettaient pas de visualiser correctement les structures cellulaires. Ceci a posé un réel problème à cette étape de mise au point des conditions de formation des vaisseaux sur puce. De plus, un tel remplissage en deux étapes était peu envisageable avec notre approche de focalisation hydrodynamique. En effet, pour s'en servir dans les vaisseaux sur puce, cela aurait signifié de réaliser une première structure triphasée par focalisation hydrodynamique avec Biomimesys, puis une seconde fois avec du collagène. Pour éviter de mettre au point un tel processus assez fastidieux et en raison de l'incompatibilité de la matrice Biomimesys seule avec l'adhérence, la survie et l'établissement d'une monocouche de cellules endothéliales, nous avons choisi pour la suite de l'étude de remplacer l'hydrogel Biomimesys par du collagène I, un hydrogel éprouvé pour l'établissement des cellules endothéliales en vaisseaux-sur-puce [232].

### 3.1.1.2.3 Focalisation hydrodynamique avec du collagène I

Afin de pouvoir former un hydrogel, la solution de collagène utilisée doit être concentrée (3mg/ml). Comme dans le cas de l'hydrogel Biomimesys, une telle solution de collagène concentrée est plus visqueuse que l'eau et demande donc l'utilisation d'une solution aussi visqueuse dans le canal central pour obtenir des phases de largeurs équivalentes. La solution d'huile de silicone utilisée

précédemment aurait pu convenir, toutefois, nous avons choisi de ne plus l'utiliser pour la phase centrale en raison de nos doutes sur sa biocompatibilité. Dans le but d'utiliser une solution aqueuse dans le canal central, nous avons donc opté pour une technique basée sur une variation de la résistance fluïdique des tubes d'entrée de la puce pour compenser les différences de viscosité des fluides. La Figure 3-9 montre la différence d'épaisseur des phases de collagène obtenues entre un dispositif avec des tubes d'entrée de sections égales pour toutes les voies (A) et un dispositif avec un tube avec une section réduite pour la voie centrale, connectée à un réservoir d'eau (B). Dans le premier cas, les phases de collagène sont clairement plus fines et la phase centrale occupe quasiment tout le canal central. Au contraire dans le second cas, avec l'utilisation d'une résistance fluïdique plus élevée, la largeur des phases est beaucoup plus homogène, ce qui répond bien à notre souhait.

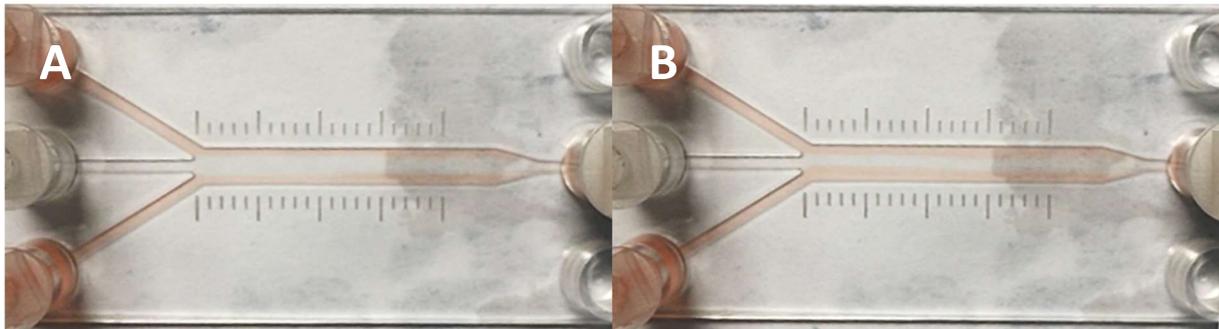


Figure 3-9 Focalisation hydrodynamique de collagène (rose) et d'eau stérile, tuyaux de section normale (A) et tuyaux de section réduite (B), une graduation = 1mm

#### 3.1.1.2.4 Amélioration de l'approche par utilisation d'un contrôleur de pression

Une des raisons pour lesquelles nous avons choisi la technique de focalisation hydrodynamique était qu'elle offrait la possibilité de moduler à façon la taille des phases et donc les dimensions des futurs vaisseaux sur puce. Bien que l'approche précédente ait permis d'obtenir un résultat satisfaisant, elle ne permettait pas de moduler facilement ces dimensions. En effet, le diamètre des tubulures et de la puce étant fixés en amont de l'expérience, ils ne pouvaient pas être modifiés au cours de celle-ci. De plus, dans le cas du collagène, la viscosité de la solution augmentait en fonction de la température [233], ceci pouvait perturber l'équilibre prédéfini. Une solution permettant de contrôler chaque voie en entrée de la puce semblait donc plus adaptée pour mieux contrôler ces variables. Pour passer du procédé en aspiration à un tel procédé en injection, chacune des trois entrées aurait dû être connectée à un pousse-seringue indépendant. Cela aurait toutefois rendu le contrôle des écoulements assez difficile. D'autre part, les pousse-séringes étant contrôlés en débit, lorsqu'un changement de consigne de flux est appliqué, la phase transitoire peut durer quelques secondes, un délai trop long pour contrôler correctement l'établissement des trois phases du dispositif. Le dispositif de mise en flux a donc été modifié pour intégrer un contrôleur de pression en amont de la puce, dont le rôle était de pressuriser des réservoirs d'eau ou d'hydrogel pour permettre leur mise en mouvement au sein de la puce. Le contrôleur de pression utilisé (MFCS, Fluigent) permettait ainsi une réactivité sur le contrôle des flux quasi instantanée. De plus, il supportait des pressions allant de 0 à 7 bars, suffisantes pour injecter des hydrogels visqueux tels que ceux utilisés au sein des canaux microfluidiques.

Afin de visualiser correctement les différentes phases, cette nouvelle configuration expérimentale a tout d'abord été testée avec de l'eau distillée teintée avec des colorants alimentaires jaune et bleu. Les répartitions des phases obtenues sont montrées dans la Figure 3-10. La pression appliquée sur le

réservoir d'eau connecté à la voie centrale est restée constante (V2, 200 mbar) et la pression appliquée aux voies latérales (V1, V3) a été modulée de 200 à 300 mbar. Les résultats montrent que la taille de la phase centrale était bien définie par la différence de pression entre les voies. Ainsi, si  $V1=V2=V3$ , les phases étaient de tailles sensiblement équivalentes, la phase centrale mesurant  $260 \pm 7\mu\text{m}$ . Cependant, si  $V1=V3 > V2$  alors la phase centrale devenait plus fine,  $89 \pm 9\mu\text{m}$  pour 250mbar et  $19 \pm 3\mu\text{m}$  pour 300mbar (5 mesures par canal). Ainsi, plus la pression sur les voies latérales V1 et V3 était forte, plus la phase centrale s'affinait. Ceci est parfaitement en accord avec les règles de la focalisation hydrodynamique [144].

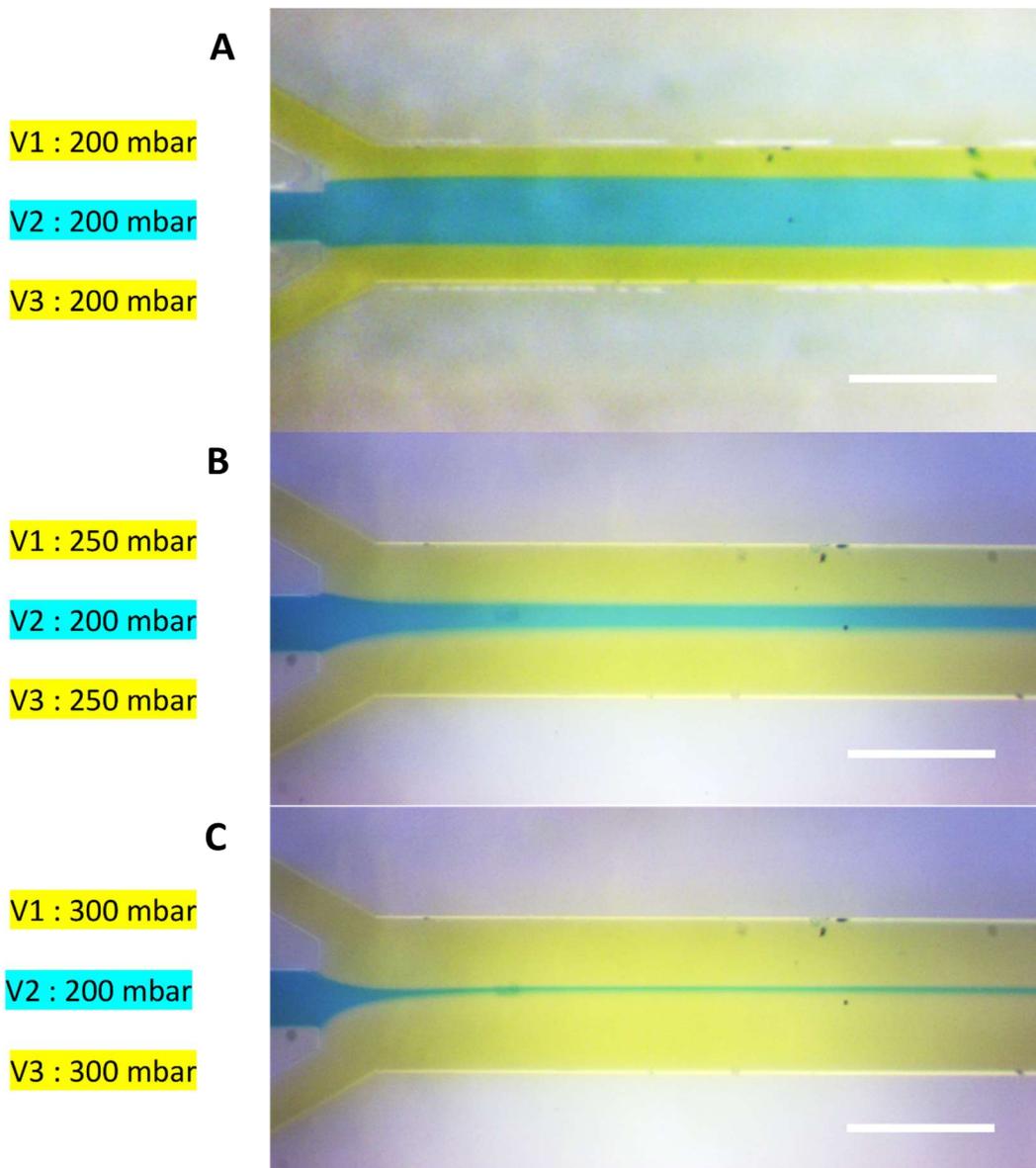


Figure 3-10 Focalisation hydrodynamique avec d'eau colorée générée par un contrôleur en pression placé en amont de la puce microfluidique, barre=  $400\mu\text{m}$

Enfin, le montage expérimental a été complété en connectant également la sortie de la puce à un réservoir pressurisé *via* le contrôleur de pression. Ce choix a été fait afin de permettre de contrôler encore plus finement l'arrêt du flux tout en conservant des phases distinctes, en appliquant une contre-pression, en opposition avec le flux généré *via* les entrées fluidiques. Des réservoirs contenant une solution à  $3\text{mg/mL}$  de collagène ont été connectés aux deux voies d'entrées latérales. Un réservoir

contenant une solution de même composition, mais où le collagène a été remplacé par une solution de glucose à 20% afin d'augmenter sa viscosité par rapport à une solution purement aqueuse, a été connecté à la voie d'entrée centrale. Dans ces conditions, les trois phases ont bien été obtenues une fois la focalisation hydrodynamique établie (Figure 3-11).

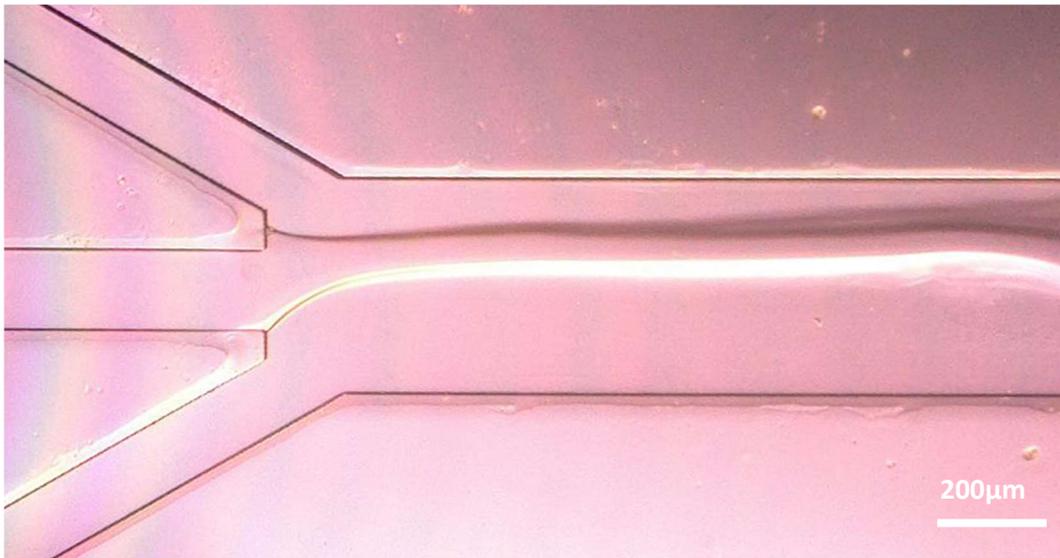


Figure 3-11 Trois phases obtenues par focalisation hydrodynamique de collagène et d'une solution de glucose.

Notre but à terme étant d'ensemencer des cellules endothéliales sur un hydrogel déposé sur les deux phases latérales du canal, cette approche nécessitait d'arrêter le flux et la déconnexion des puces une fois la structure générée. Le défi consistait donc à pouvoir conserver les trois phases régulières, bien séparées, obtenues par focalisation hydrodynamique après l'arrêt du flux. Toutefois, dans les conditions présentes, il a été très difficile de conserver la structure triphasée une fois le flux interrompu malgré l'utilisation de la contre pression.

Afin de réussir à conserver les trois phases collagène / glucose / collagène, nous avons alors décidé de profiter de la propriété de thermo réticulation du collagène. En effet, la solution de collagène a été préparée de façon à pouvoir réticuler à 37°C à pH neutre. Notre idée consistait alors à faire changer rapidement le collagène de son état liquide, au moment de la focalisation hydrodynamique, à un état gélifié, dans le but de conserver la structure générée.

#### 3.1.1.2.5 Exploitation des propriétés de thermo-réticulation du collagène I

Les premiers essais ont consisté à placer la puce microfluidique sur une plaque de verre recouverte d'*Indium Tin Oxide* (ITO) transparente, chauffante et réglée à 37°C. Cette méthode n'a pas abouti de manière satisfaisante car le collagène en mouvement, même très lent, ne restait pas assez longtemps au niveau de la zone chauffée pour gélifier.

D'autre part, au cours de nos expériences, nous avons constaté que les phases de collagène n'étaient pas complètement homogènes pendant le procédé de focalisation hydrodynamique. En effet, il est apparu qu'à l'entrée du canal central, la solution de collagène n'était plus homogène mais qu'une partie commençait déjà sa gélification (Figure 3-12 A). Les observations ont montré que le collagène commençait à se solidifier à l'intérieur du circuit microfluidique avant d'arriver dans la puce.

En effet, bien que les réservoirs de solution de collagène aient été placés sur glace pour ralentir la gélification du collagène, les tuyaux ainsi que la puce microfluidique étaient à température ambiante et la gélification commençait dans ces parties du système. Il était même possible de former une fibre de collagène qui se maintenait alors tout le long du canal central (Figure 3-12 B).

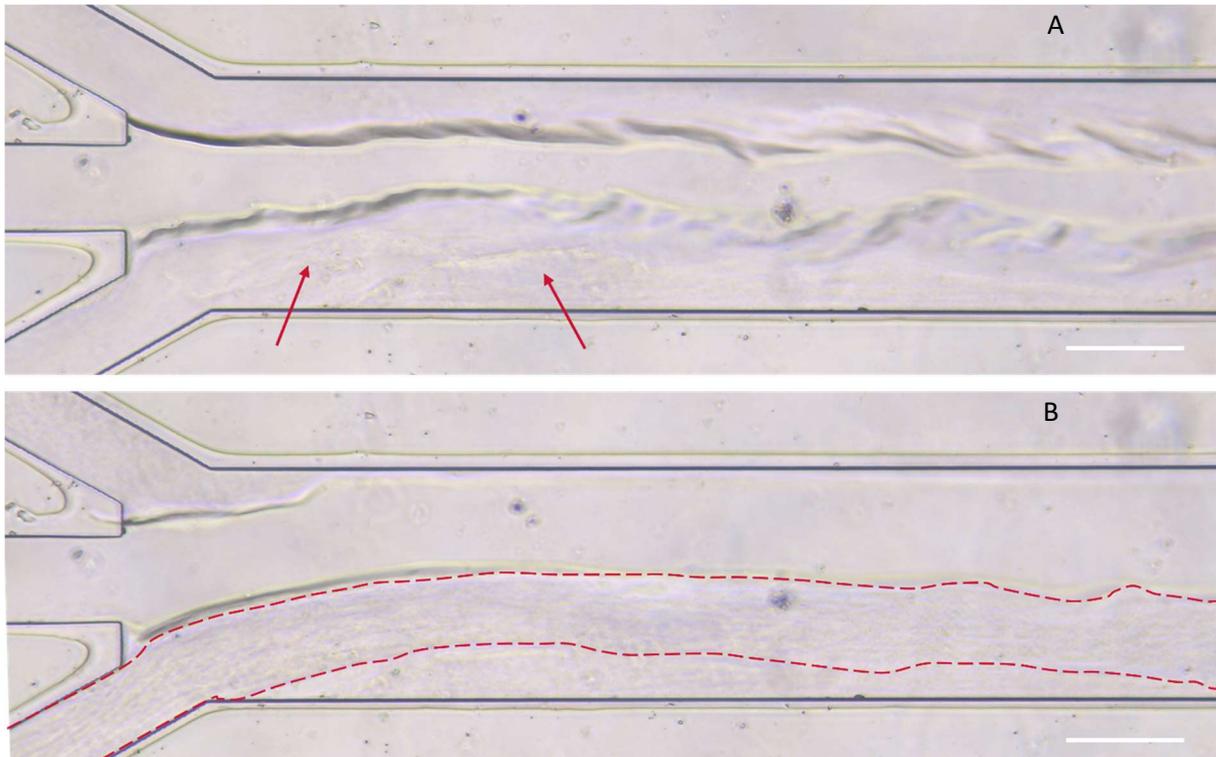


Figure 3-12 Gélation partielle du collagène observée dans la puce pendant le processus de focalisation hydrodynamique, barre= 200 $\mu$ m

Le contrôle en pression et le faible diamètre des tuyaux microfluidiques créaient un effet filière pour le collagène. En quelque sorte, la fibre a été extrudée à partir des tubes et la taille de celle-ci dépendait de la largeur des canaux d'entrée de la puce. La formation inattendue de cette fibre de collagène gelé s'est avérée représenter une bonne perspective pour créer une structure stable dans le canal. L'approche a donc été répétée, avec cette fois pour objectif d'exploiter volontairement cet effet filière. La focalisation hydrodynamique est restée indispensable pour permettre de conserver la séparation des fibres de collagène et leur placement correct de part et d'autre du canal central. Ainsi, à l'apparition des fibres solides de collagène, la contre-pression a progressivement été augmentée jusqu'à stopper complètement leur avancée une fois le canal rempli. La structure finale obtenue montre bien trois phases distinctes, régulières et stables (Figure 3-13). La phase centrale est composée de tampon de glucose et pourra être remplacée par du milieu de culture. Le lumen obtenu mesure 150 $\mu$ m de large, sur toute la longueur du canal.

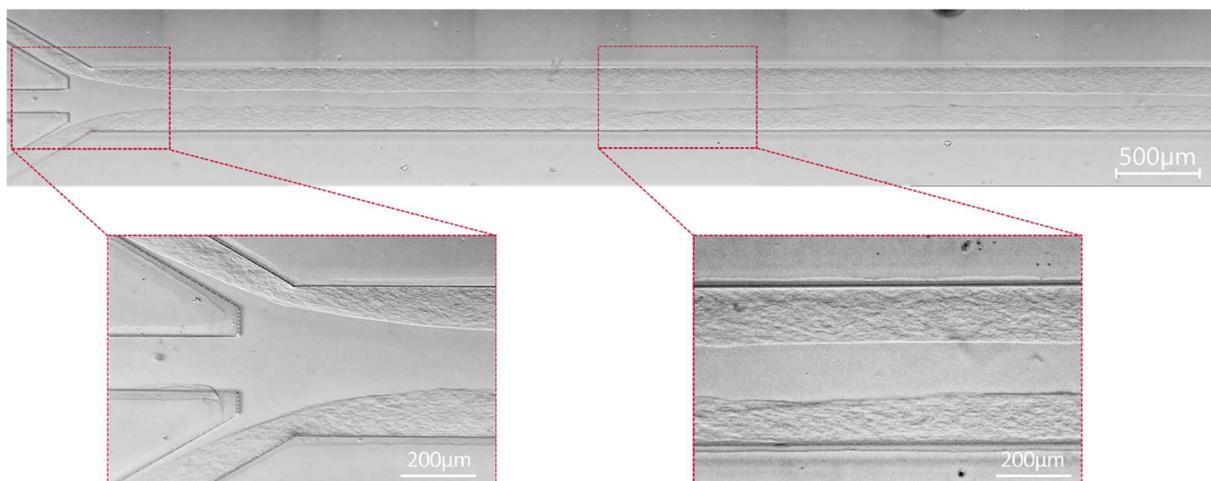


Figure 3-13 Structure triphasée de collagène/glucose/collagène obtenue par focalisation hydrodynamique et effet filière

La focalisation hydrodynamique tirant partie de l'effet filière du collagène a donc permis de créer une structure triphasée collagène/glucose/collagène telle qu'envisagée et de manière reproductible.

La pression appliquée sur les réservoirs de collagène étant de l'ordre de 1bar, le système restait très sensible aux perturbations. En effet, si l'une des fibres se rompait, il existait un réel risque de perdre l'équilibre qui permettait à la structure de rester en place. De plus, cette configuration de la puce microfluidique présentait des angles vifs qui généraient des contraintes importantes sur les fibres de collagène.

### 3.1.1.3 Évolution de la géométrie des puces microfluidiques

Afin d'améliorer le déroulement du processus et de réduire les risques de rupture des fibres, nous avons fait évoluer les caractéristiques géométriques de nos puces microfluidiques. La première évolution a consisté à adoucir les angles présents sur le chemin fluide emprunté par le collagène. Le canal central mesurait désormais 1800µm x 400µm x 85µm (L x w x h), la puce ne présentait plus d'angle vifs mais seulement des lignes droites ou des courbes (Figure 3-14). Les entrées et sorties fluidiques des puces ont également été remaniées pour correspondre aux espacements des puits d'un format SBS 96-puits.

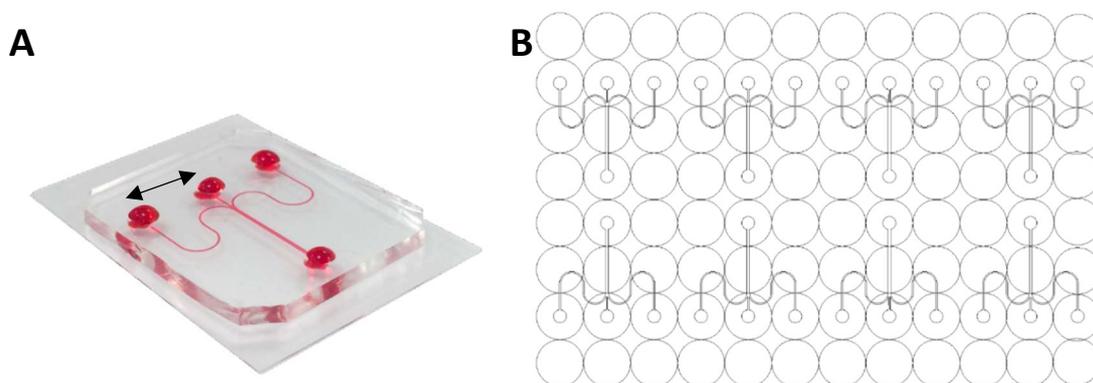


Figure 3-14 Nouvelle géométrie de la puce microfluidique, A : vue d'ensemble, B : Répartition sur une plaque SBS 96-puits , flèche = 9mm

Le moule a été fabriqué par photolithographie de résine SU-8 sur substrat de silicium. Les canaux obtenus ont été caractérisés avec un profilomètre et imagés au microscope électronique à balayage (MEB) (Figure 3-15)

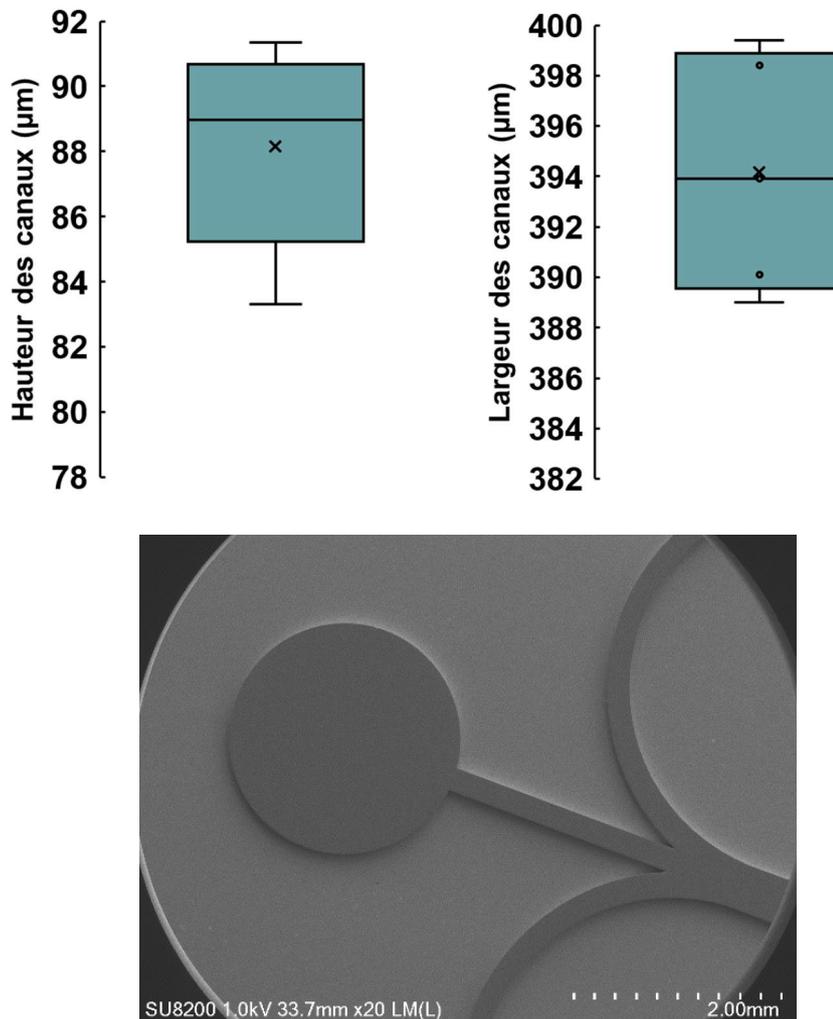


Figure 3-15 Caractérisation des dimensions des canaux obtenus par photolithographie de résine SU-8 (haut) et imagerie au MEB de l'entrée de la puce (bas)

La structure obtenue par focalisation hydrodynamique de collagène en utilisant cette nouvelle puce a montré la formation de fibres régulières et cohésives, l'absence d'angle vifs a réduit les contraintes exercées sur celles-ci (Figure 3-16). La manipulation des fibres de collagène, par des variations de pression appliquées sur les réservoirs a, elle aussi, été facilitée par cette nouvelle géométrie. Le lumen obtenu dans ces conditions mesure en moyenne 100µm de large.

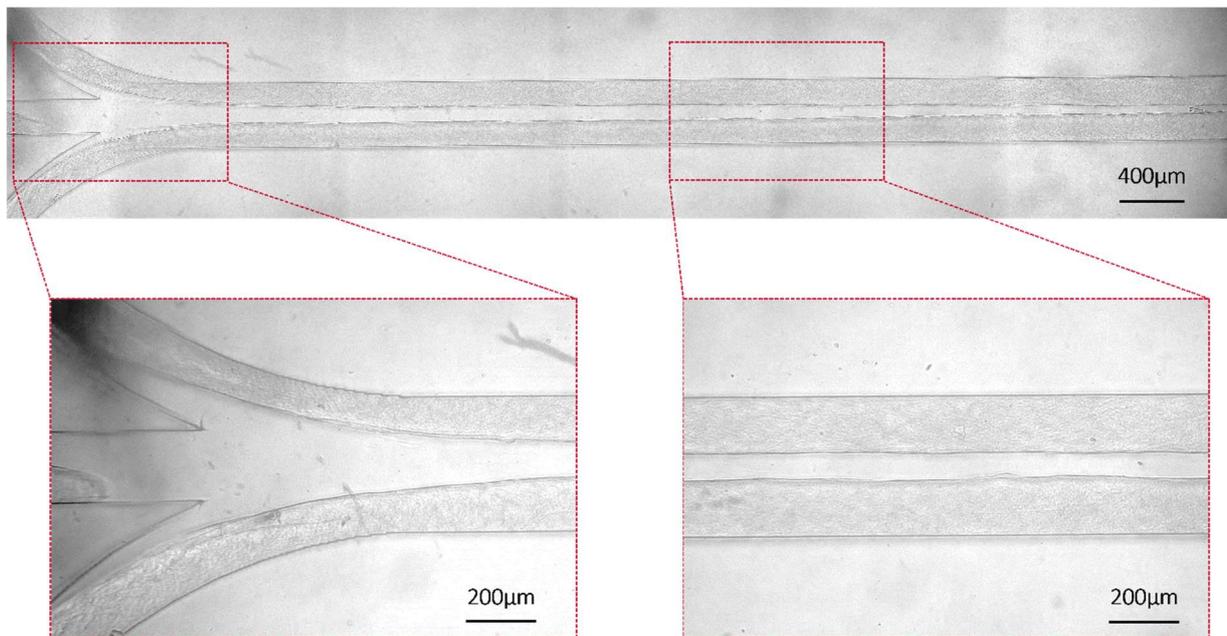


Figure 3-16 Structure triphasée de collagène/glucose/collagène obtenue par focalisation hydrodynamique et effet filière dans la puce sans angle vif

La taille des fibres de collagène étant conditionnée par la largeur des canaux d'entrée, des puces avec des tailles de canaux différentes ont été conçues. Celles-ci ont permis de former des structures avec un lumen de taille variable afin de simuler plusieurs diamètres de vaisseaux. Pour chaque configuration, la largeur  $W$  du canal central est égale à trois fois la largeur  $w$  des canaux d'entrée,  $W = 3 \times w$  (Figure 3-17) et dans des dimensions toujours compatibles avec le format SBS 96puits.

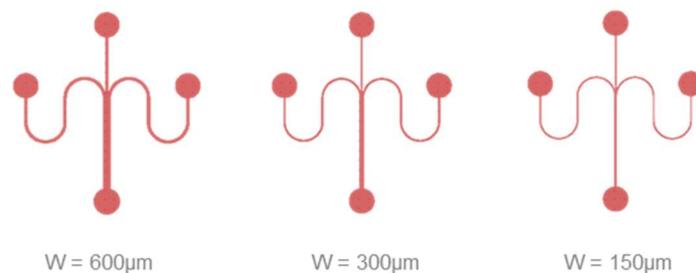


Figure 3-17 Schématisation des puces avec trois largeurs de canal différentes

Pour chaque configuration, le processus de focalisation hydrodynamique des fibres de collagène a été réalisé. La structure triphasée attendue a été obtenue pour les deux géométries les plus larges, 600µm et 300µm (Figure 3-18) ainsi que la variation de taille souhaitée pour le lumen selon la largeur du canal : environ 300µm pour le canal de 600µm et 100µm pour le canal de 300µm. Cependant, pour les puces avec un canal de 150µm, nous ne sommes parvenus à obtenir qu'une seule fibre de collagène à la fois. En effet la finesse des canaux latéraux rendait leur obstruction fréquente et souvent irréversible (Figure 3-18 C).



Figure 3-18 Structures de collagène obtenues avec les différentes tailles de canal central, A :  $W = 600\mu\text{m}$ , B :  $W = 300\mu\text{m}$ , C :  $W = 150\mu\text{m}$ , barre =  $200\mu\text{m}$

#### 3.1.1.4 *Ensemencement des cellules endothéliales*

Une fois ces conditions d'établissement de la matrice de collagène maîtrisées, nous avons entrepris d'y ensemer des cellules endothéliales. Pour cela, la solution de glucose du lumen a été remplacée par du milieu de culture et la puce a été préincubée quelques minutes à  $37^{\circ}\text{C}$ .

L'ensemencement des cellules a posé des problèmes techniques majeurs. D'une part, les premiers essais d'ensemencement de cellules ont été réalisés par aspiration après la connexion d'un réservoir contenant les cellules ( $30 \cdot 10^6$  cellules/mL) à l'entrée de la puce et d'une seringue de 1mL à la sortie de la puce. Cette concentration de cellules n'était pas suffisante pour garantir un ensemencement satisfaisant et l'établissement d'une monocouche confluente (Figure 3-19). La puce présentée dans la Figure 3-19 ne comportait qu'une seule fibre de collagène car le second canal latéral s'est trouvé obstrué au cours du procédé de focalisation hydrodynamique.

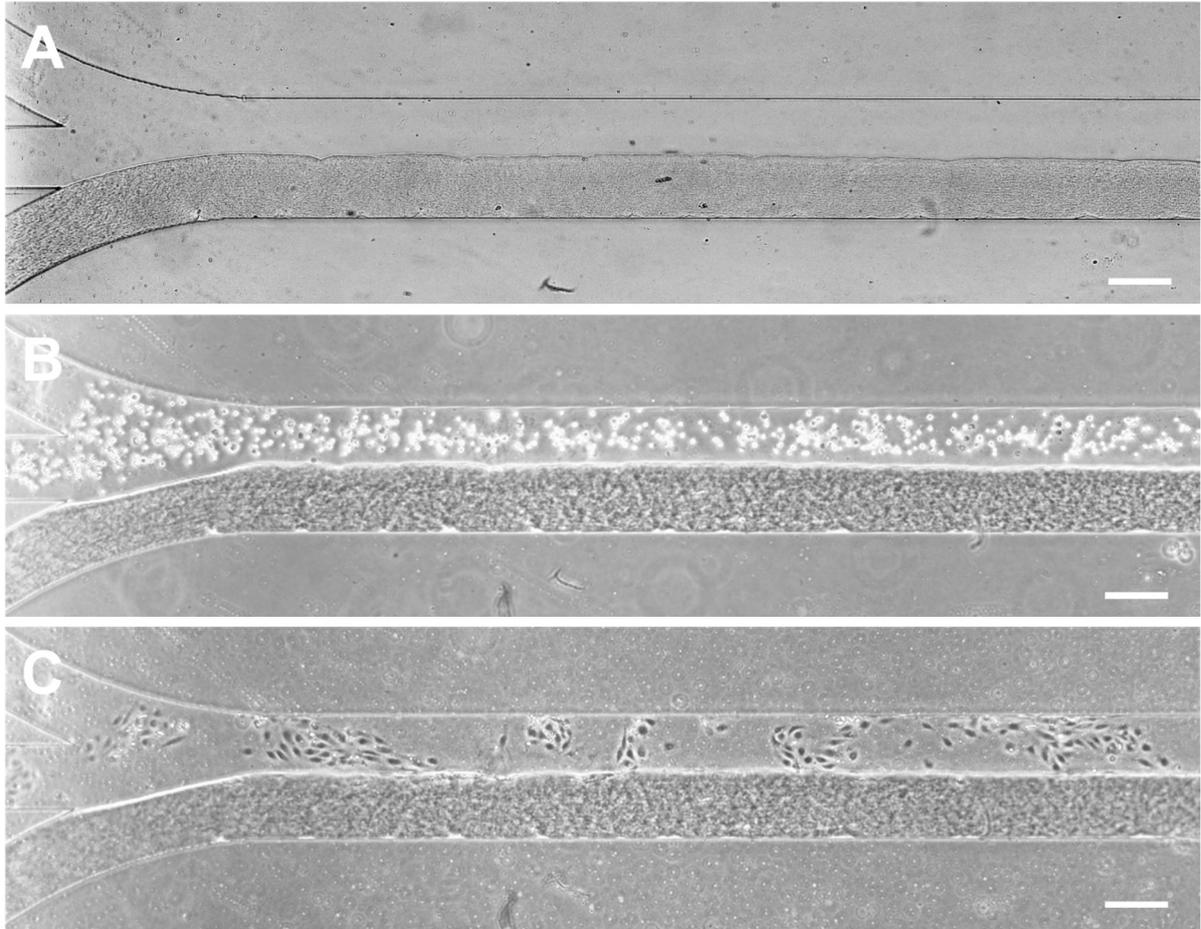


Figure 3-19 Etapes d'ensemencement des cellules endothéliales au sein de la puce microfluidique. A : fin de la procédure de focalisation hydrodynamique, B : Après l'injection des cellules, C : 24h après l'ensemencement. Barre = 200 $\mu$ m

L'augmentation de la concentration cellulaire initiale à  $50 \cdot 10^6$  cellules/mL a permis d'obtenir un remplissage complet du lumen (Figure 3-20 B). Une fois incubées pendant 24h, l'établissement des cellules n'a cependant pas été satisfaisant, celles-ci ne s'étalant pas et ne formant pas une monocouche confluente (Figure 3-20 C).

D'autre part, la manipulation de la seringue en sortie de la puce était délicate et il était courant que l'aspiration entraîne une rupture des fibres de collagène dans le canal central (Figure 3-20 B).

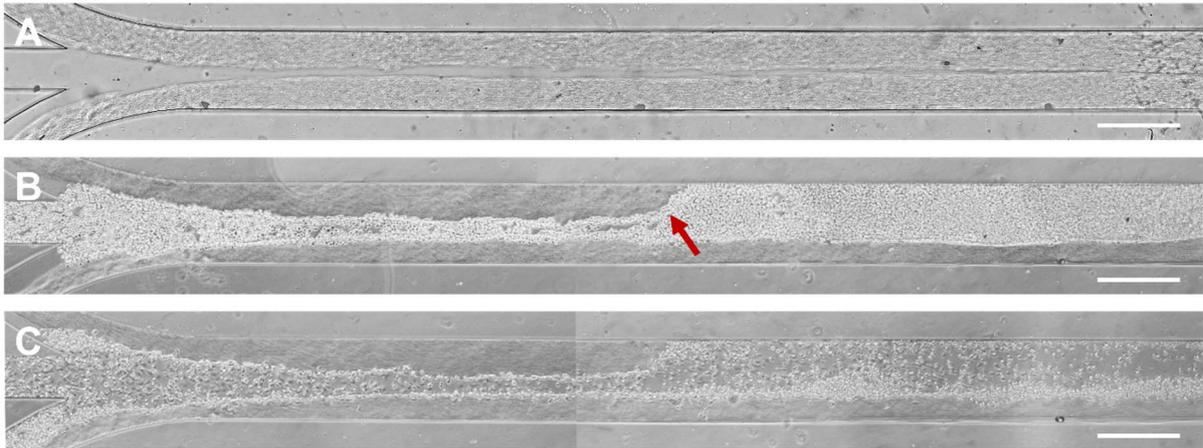


Figure 3-20 Ensemencement des cellules endothéliales au sein de la puce microfluidique. A : fin de la procédure de focalisation hydrodynamique, B : Après l'injection des cellules, C : 24h après l'ensemencement. Barre = 400 $\mu$ m

De plus, les échanges de milieu avec la seringue se sont avérés également très délicats car ceux-ci avaient tendance à décrocher les cellules présentes dans le lumen. Après 72h les cellules commençaient à mourir et à se détacher (Figure 3-21).

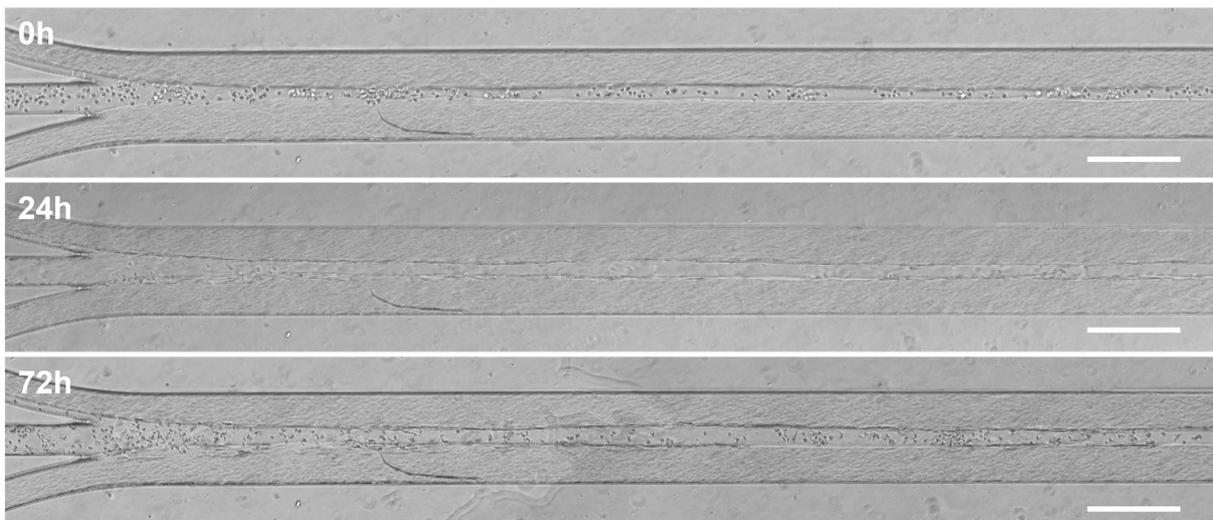


Figure 3-21 Evolution de la couche cellulaire après ensemencement dans la puce et changement de milieu avec la seringue en aspiration, barre = 400 $\mu$ m

Bien que cette approche nous ait effectivement permis d'ensemencer des cellules endothéliales sur une matrice de collagène au sein d'un canal microfluidiques, il a semblé que les conditions de culture et d'échange de milieu n'étaient pas optimales pour des raisons que nous n'avons pas identifiées.

### 3.1.1.5 Bilan de l'approche de focalisation hydrodynamique

Dans cette section, nous avons mis au point les conditions de création d'une structure 3D d'hydrogel *via* la technique de focalisation hydrodynamique. Pour la mise en flux du système, nous avons retenu un dispositif de contrôle en pression qui permettait de mettre en mouvement des fluides

très visqueux dans des canaux microfluidique et qui offrait une maîtrise fine des flux. Concernant la matrice qui a servi de substrat aux cellules, nous nous sommes concentrés sur le collagène dont les propriétés de thermo-réticulation permettent d'utiliser un effet filière et ainsi de créer un lumen entouré de deux fibres de collagène. Cette méthode a été répétée avec plusieurs géométries de puces et la capacité à produire des lumens de largeurs différentes a été démontrée. Enfin des cellules endothéliales ont étéensemencées au sein du système, mais celles-ci n'ont malheureusement pas formé une monocouche confluente et viable dans le temps.

Cette approche de focalisation hydrodynamique pour créer des vaisseaux sanguins sur puce était originale et aurait pu être poursuivie pour mettre au point des conditions de culture optimales pour les cellules endothéliales. Cependant, le dépôt de matrice au sein des puces s'avérait bien trop délicat à maîtriser, chronophage et ne nous permettait pas d'envisager une production de puces à moyen/haut débit. Nous avons donc décidé de nous orienter vers une seconde technique pour générer un lumen au sein d'un hydrogel.

### 3.1.2 Création de vaisseaux sanguins sur puce par *viscous finger patterning*

La seconde méthode que nous avons mise en œuvre pour l'établissement d'une structure 3D en collagène est le « modelage par digitation dans un fluide visqueux » ou *viscous finger patterning* (VFP). Contrairement à la technique de focalisation hydrodynamique présentée dans la section précédente, le VFP repose sur un phénomène physique passif et demande donc peu d'instrumentation. Cependant, une attention particulière doit être portée au choix des paramètres expérimentaux qui ont un impact direct sur la structure obtenue et ne peuvent pas être modifiés en cours d'expérience. Cette section présente l'ensemble des approches et choix techniques que nous avons faits afin de créer les conditions expérimentales pour former un vaisseau fonctionnel de manière reproductible et à moyen débit. Nous nous intéresserons notamment à la méthode de mise en mouvement du fluide créant la digitation, à la technique d'ensemencement des cellules et au processus de double VFP original que nous avons mis au point.

#### 3.1.2.1 Choix de la méthode de VFP

Pour créer un lumen dans un canal microfluidique *via* la technique de VFP, trois méthodes sont décrites dans deux études [157], [158]. Elles consistent toutes à créer une différence de pression négative entre l'entrée et la sortie du canal. La première étude génère cette différence de pression en jouant sur la taille des ports d'entrée et de sortie du canal ; le port de sortie étant plus large que celui de l'entrée. Ainsi, la pression interne de la goutte en sortie est plus faible que celle en entrée. Combiné aux effets de la capillarité, ceci permet une mise en mouvement du fluide de l'entrée vers la sortie [158] (Figure 3-22 A). La seconde technique exploite l'effet de la gravité pour obtenir la différence de pression nécessaire à la mise en mouvement du fluide [157] (Figure 3-22 B). La dernière approche permet de créer une différence de pression en laissant en place le cône ayant servi à injecter le collagène dans la puce, celui-ci contenant un volume résiduel de collagène (Figure 3-22 C). Nous avons testé ces trois approches et les taux de réussite pour la création d'un lumen régulier sont reportés dans le Tableau 3-1. Chaque technique a été essayée dans différentes géométries de puces.

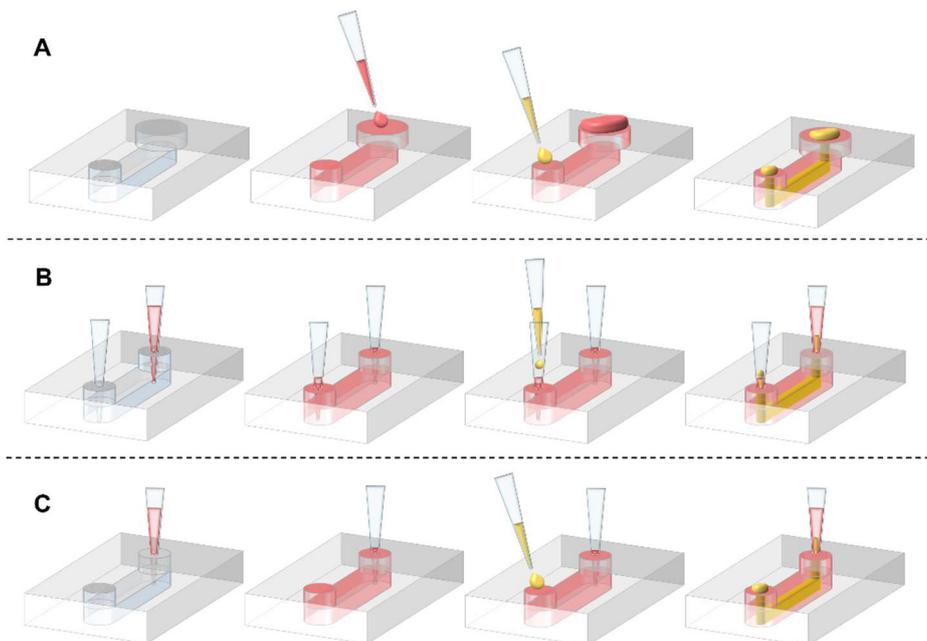


Figure 3-22 Schéma des techniques de VFP, A) Pompage passif par différence de taille de port fluidiques. B) Différence de pression hydrostatique. C) Pompage passif avec cône.

Des puces de chaque géométrie ont été conçues et fabriquées par gravure de silicium en DRIE (procédé Bosh) pour les canaux de 250µm de hauteur, par photolithographie de résine de SU-8 pour les canaux de 100µm et de 300µm.



Figure 3-23 Dessin technique du moule en silicium de 4 pouces de diamètre pour la fabrication des canaux destinés au VFP. En haut à gauche puce de 400µm de large, en bas à gauche les canaux de 1mm, en haut à droite les canaux avec restrictions de 200/400µm et en bas à droite des restrictions de 400/1000µm

La technique utilisant le cône laissé en place est celle qui a montré le plus grand taux de réussite (Tableau 3-1) et qui a donc été choisie pour la suite des travaux.

Tableau 3-1 Taux de réussite des techniques de VFP en fonction des puces dans lesquelles elles ont été pratiquées (NT = non testé)

	Hauteur	Largeur	Différence de taille de l'entrée et de la sortie	Effet de gravité	Différence de pression créée avec un cône en sortie
Canal simple	100µm	1mm	NT	0%	0%
		400µm	NT	0%	0%
	250µm	1mm	33%	NT	NT
		400µm	0%	NT	100%
	300µm	1mm	NT	NT	83%
		400µm	NT	NT	42%
Canal avec restrictions	250µm	200/400µm	16%	NT	100%
		400/1000µm	16%	NT	NT

### 3.1.2.2 Choix de la taille des canaux

Les dimensions des microcanaux influencent directement les dimensions des lumens créés par VFP [158]. Nous avons donc testé plusieurs dimensions pour les canaux microfluidiques dans l'objectif de générer des vaisseaux sanguins de quelques centaines de  $\mu\text{m}$  de diamètre au maximum. Le VFP avec cône ayant un taux de réussite très faible dans un canal de  $100\mu\text{m}$  de hauteur, nous avons opté pour une hauteur de canal de  $300\mu\text{m}$  pour la suite de l'étude. Concernant la largeur des canaux, nous avons choisi deux dimensions ;  $400\mu\text{m}$  et  $1\text{mm}$  de large afin de nous permettre de créer des vaisseaux entourés d'une couche plus ou moins épaisse de collagène en fonction de nos besoins.

Afin de pouvoir produire des puces à moyen débit, nous avons conçu un moule au format SBS 96-puits pour chaque géométrie de puce contenant ainsi 48 canaux. Ces moules ont ensuite été fabriqués par usinage de blocs d'aluminium. Ils ont été caractérisés par mesures optiques au microscope pour la largeur et avec un comparateur mécanique sur marbre pour la hauteur (Tableau 3-2).

Tableau 3-2 Caractérisation des dimensions obtenues pour les moules en aluminium

Largeur souhaitée	Largeur mesurée	Hauteur souhaitée	Hauteur mesurée
<b>400<math>\mu\text{m}</math></b>	$398.0 \pm 4.4\mu\text{m}$ , (n=30)	<b>400<math>\mu\text{m}</math></b>	$395.8 \pm 2.3\mu\text{m}$ , (n=30)
<b>1000<math>\mu\text{m}</math></b>	$993.5 \pm 7.4\mu\text{m}$ , (n=30)	<b>300<math>\mu\text{m}</math></b>	$292.0 \pm 2.6\mu\text{m}$ , (n=30)

Enfin, ces moules ont été utilisés pour fabriquer les puces en PDMS assemblées sur lamelles de verre. Pour une manipulation plus aisée, les puces ont été généralement divisées en blocs de 12 canaux (Figure 3-24)

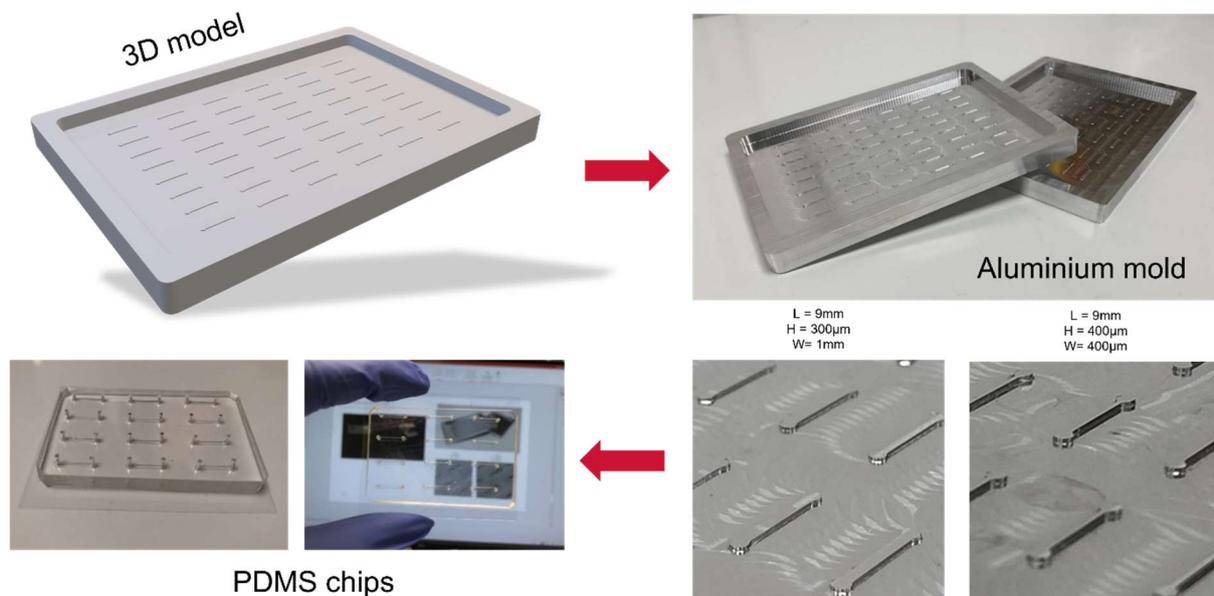


Figure 3-24 Étapes de création du moule en aluminium et de la puce microfluidique à 12 canaux moulée dans celui-ci.

### 3.1.2.3 *Ensemencement des cellules*

Les cellules endothéliales de veine ombilicale primaires humaines (HUVEC) sont un modèle très utilisé et éprouvé aussi bien en biologie qu'en approches d'organe sur puce [232]. Ce modèle avait été précédemment utilisé et validé pour la création de vaisseaux sur puce sur collagène dans le laboratoire. Il représentait donc une base de travail solide pour nos mises au point [30], [208].

#### 3.1.2.3.1 Ensemencement des cellules après la création du lumen

La première méthode mise en œuvre a consisté à fabriquer tout d'abord des lumens en collagène par VFP avec de l'EGM-2, puis à laisser le collagène geler et enfin à ensemercer des HUVEC (18 000 cellules/ $\mu$ L en EGM-2) directement dans le lumen avec une pipette. Si pour certains lumen, les cellules se sont réparties de manière homogène, pour d'autres, on a observé un ensemercement irrégulier avec des amas cellulaires et des zones sans cellule (Figure 3-25). Cette approche a été testée sur les différentes configurations de puce présentées dans le Tableau 3-1 et n'a globalement pas été assez satisfaisante du point de vue de l'homogénéité de l'ensemencement.

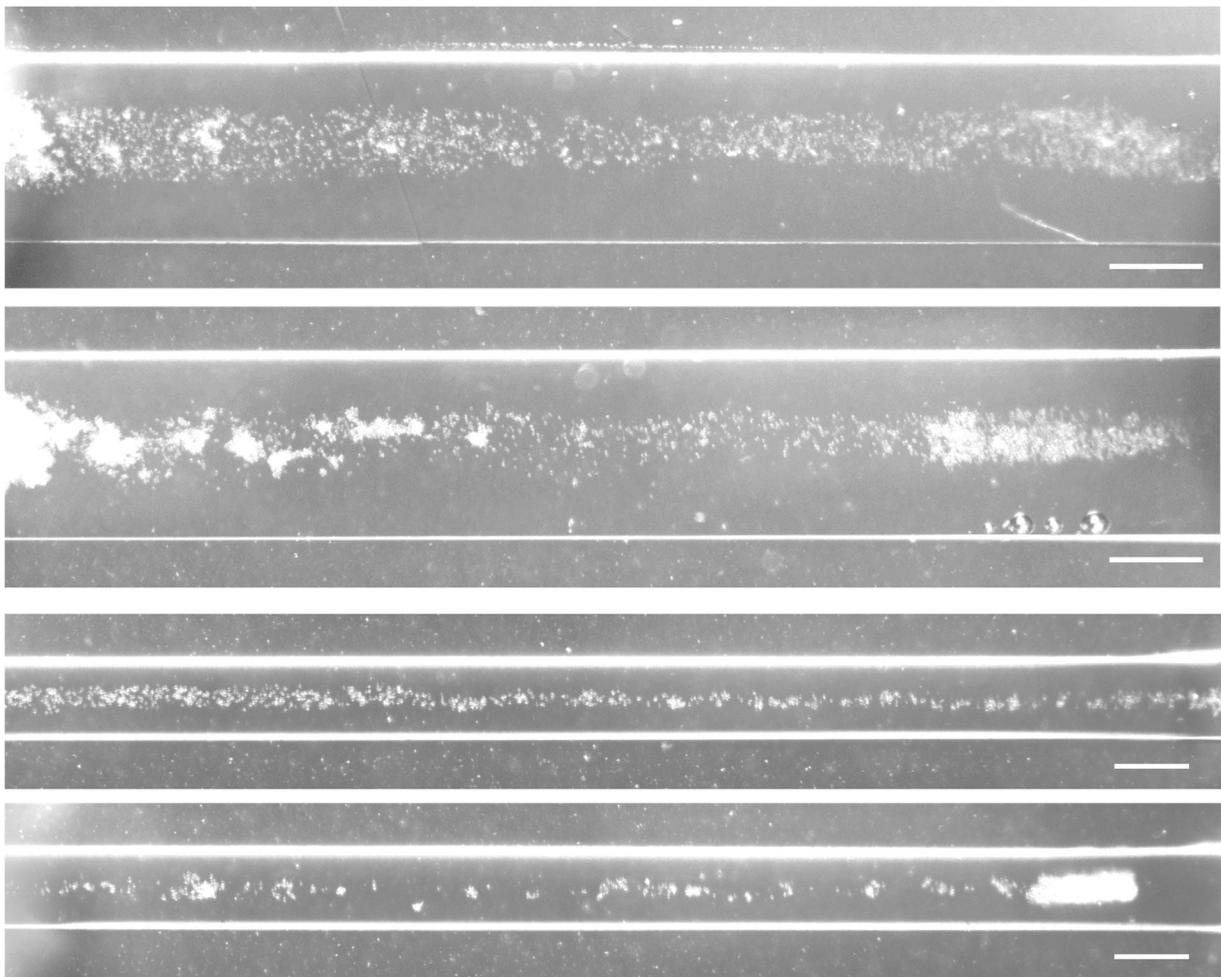


Figure 3-25 Ensemencement de cellules endothéliales par injection à l'intérieur de lumen préalablement créés par VFP dans des puces de 400 $\mu$ m et 1mm, barre = 400 $\mu$ m

### 3.1.2.3.2 Ensemencement des cellules simultanément au VFP

Afin d'obtenir de manière fiable un ensemencement plus homogène des cellules au sein de nos dispositifs, nous avons eu l'idée de combiner la création du lumen par VFP avec l'ensemencement des cellules. Pour cela, le lumen a été formé au sein de la solution de collagène par VFP directement avec la suspension cellulaire d'HUVEC (20 000 cellules/ $\mu$ L). Cette approche a parfaitement fonctionné et la répartition des cellules s'est avérée nettement plus régulière qu'avec la technique d'injection classique précédente (Figure 3-26). Cette méthode originale a été d'autant plus intéressante qu'elle a permis de visualiser directement la formation du lumen sous microscope.

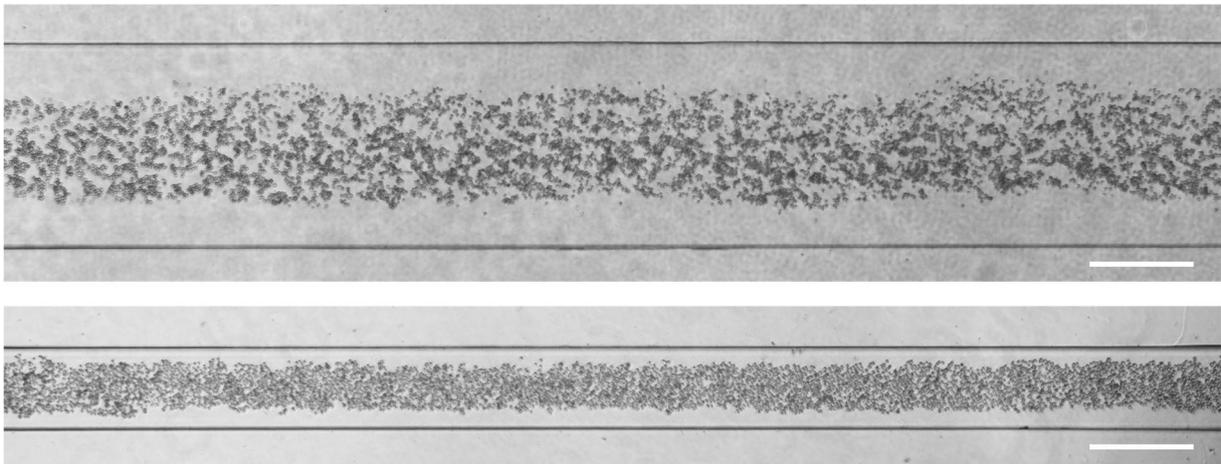


Figure 3-26 Ensemencement de cellules endothéliales combiné à la création du lumen par VFP dans des puces de largeur 1mm (haut) et 400 $\mu$ m (bas), barre = 400 $\mu$ m

Toutefois, même si l'ensemencement a été fortement amélioré, il est apparu que les cellules avaient globalement tendance à s'agglomérer. Ceci a notamment posé un problème pour la reproductibilité du procédé car certains agrégats assez larges bloquaient l'entrée du canal et perturbaient le bon déroulement du VFP.

### 3.1.2.3.3 Composition de la suspension cellulaire

Pour pallier ce problème d'agrégation des cellules endothéliales, nous avons alors optimisé la composition de la suspension cellulaire. Jusqu'à ce point, les HUVEC étaient reprises en suspension dans leur milieu de culture, l'EGM-2. Sachant que l'absence de calcium et de magnésium pouvait favoriser la dissociation cellulaire [234], nous avons tout d'abord repris les cellules en PBS sans calcium et sans magnésium pour minimiser le nombre d'agrégats. Cette approche a permis de sensiblement diminuer l'agglomération des cellules et s'obtenir un ensemencement correct (Figure 3-27). Cependant, les cellules supportaient mal d'être maintenues dans cette solution pendant le temps de réalisation de la procédure. De plus, l'absence de calcium et de magnésium perturbait vraisemblablement l'adhérence des cellules au collagène en interférant dans l'association des intégrines cellulaires avec le collagène [235], ceci résultant en un vaisseau incomplet après 48h de culture.



Figure 3-27 Comparaison d'ensemencement de cellules endothéliales en PBS et en EGM-2, barre = 400 $\mu$ m

Sur la base des travaux précédents de l'équipe [30], nous avons alors ajouté du Dextran à l'EGM-2 à la concentration finale de 3% pour profiter de son effet surfactant et ainsi diminuer l'apparition d'agrégats cellulaires. Ceci a permis d'obtenir une répartition plus homogène des cellules dans le lumen (Figure 3-28) mais, en diminuant ainsi la tension de surface de la suspension cellulaire, les lumens obtenus étaient plus larges qu'avec l'utilisation d'une suspension cellulaire en EGM-2, en accord avec *Dong et al.*[152].

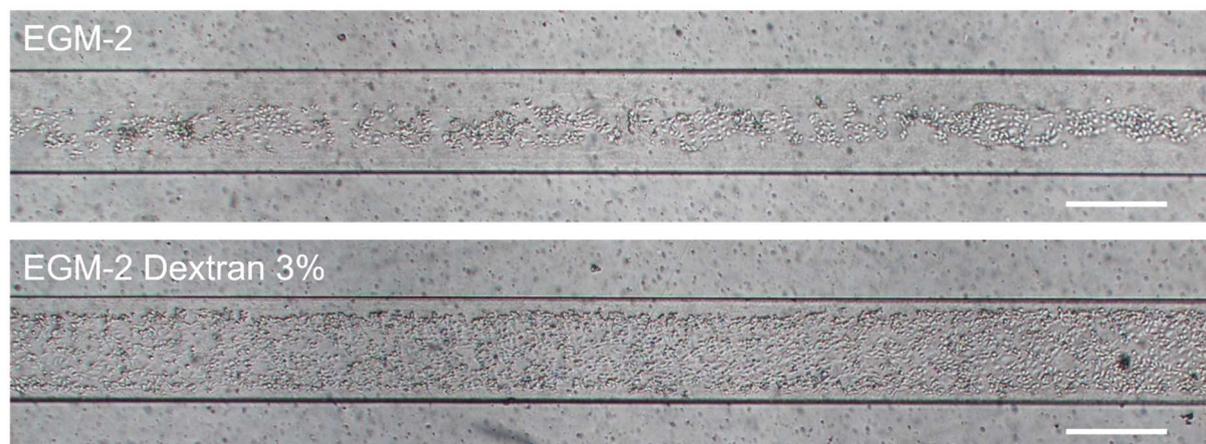


Figure 3-28 Comparaison d'ensemencement de cellules endothéliales en EGM-2 seul et en EGM-2 3% Dextran, barre = 400 $\mu$ m

A ce stade, nous étions donc parvenus à créer un vaisseau sur puce initial, perfusable, formé d'une couche endothéliale confluyente et stable en culture sur plusieurs jours (Figure 3-29)

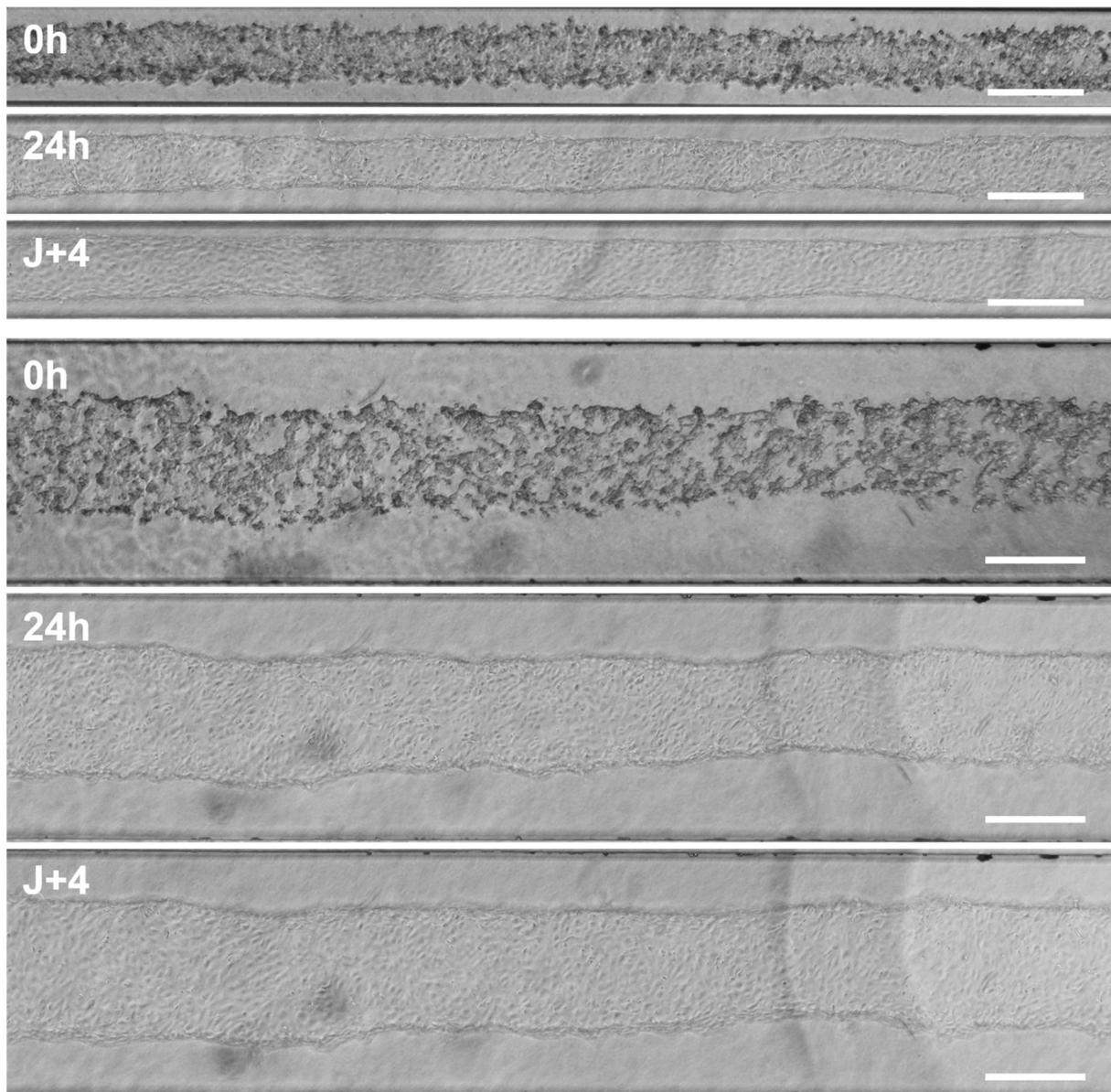


Figure 3-29 Evolution d'un vaisseau créé par VFP directement avec la suspension cellulaire en EGM-2, 3% dextran dans une puce de 400µm de largeur (haut) et de 1mm (bas), barre = 400µm

#### 3.1.2.4 Profil géométrique du lumen

Pour garantir la reproductibilité de nos vaisseaux, il était important de s'assurer que notre approche était robuste. En effet, les conditions expérimentales telles que le volume des gouttes déposées ou le volume résiduel de collagène dans le cône laissé en place pouvaient influencer les dimensions des lumens obtenus *via* VFP [32], [157]. Nous avons donc vérifié si notre approche était sensible aux variations de ces paramètres en créant des lumens dans le collagène I au sein de nos puces dans différentes conditions. Les dimensions de ceux-ci ont été mesurées après marquage de la couche de collagène avec une solution de BSA fluorescente FITC et imagerie des lumens de collagène par microscopie confocale (Figure 3-30).

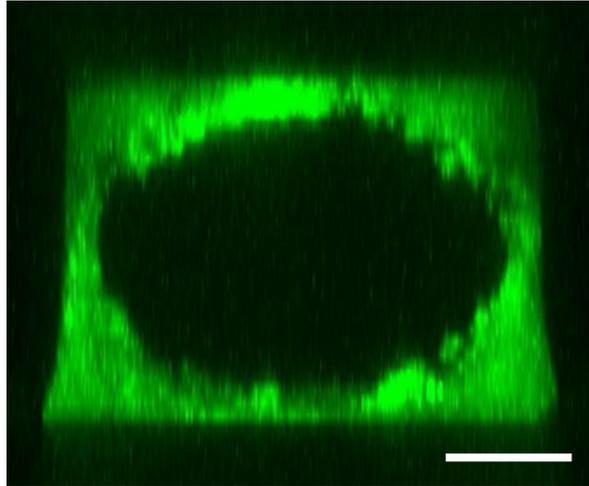


Figure 3-30 Imagerie confocale et reconstruction 3D d'un lumen de collagène. Vert = BSA-FITC fixée sur le collagène, barre = 100 $\mu$ m

Les résultats montrent que la largeur et la hauteur des lumens n'ont pas été influencés de manière significative par la variation des volumes de la goutte déposée en entrée ou du volume de collagène dans le cône en sortie (Figure 3-31 et Figure 3-32). Nous avons alors choisi de travailler avec un volume de 2 $\mu$ L pour la goutte déposée en entrée de la puce. Ce volume permettait, en effet, d'atteindre une concentration cellulaire assez élevée par canal tout en bénéficiant d'un volume de travail suffisant pour réaliser plusieurs vaisseaux en VFP. Concernant le volume de collagène en sortie, la solution utilisée étant visqueuse, elle était délicate à pipeter et nous avons opté pour un volume de 15 $\mu$ L qui était plus aisé à manipuler.

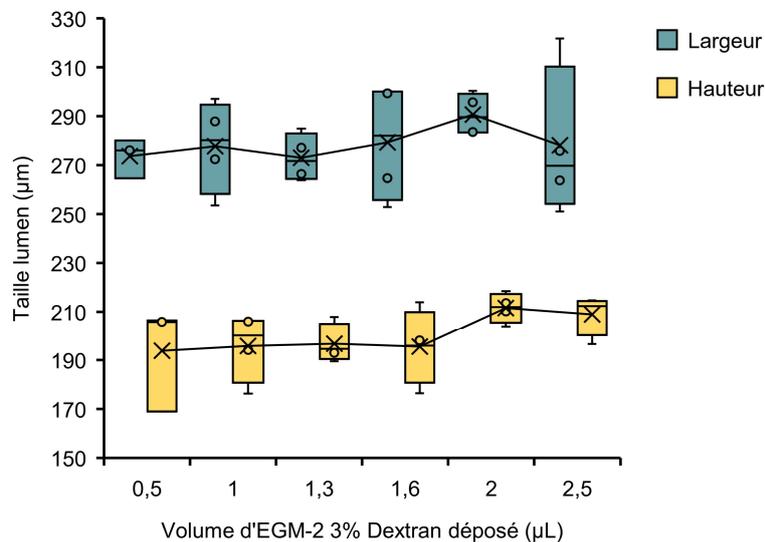


Figure 3-31 Hauteur et largeur de lumen obtenues en fonction du volume déposé en entrée de la puce

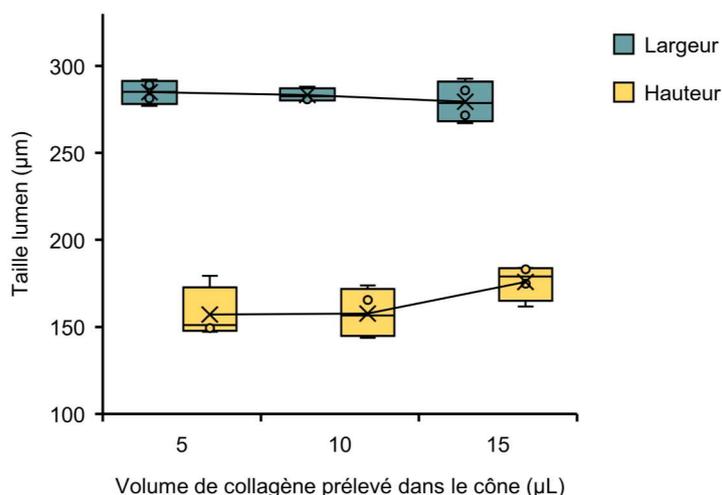


Figure 3-32 Hauteur et largeur de lumen obtenues en fonction du volume initial de collagène prélevé dans le cône en sortie

La méthode de VFP mise au point dans nos conditions expérimentales était donc robuste en termes de dimensions obtenues et peu sensible aux variations des volumes utilisés, deux avantages majeurs. En revanche, elle ne permettait pas de moduler les dimensions du lumen en variant ces paramètres comme initialement envisagé. Pour créer des vaisseaux sanguins de sections différentes, nous avons alors mis au point la technique de double VFP.

### 3.1.2.5 Mise au point du double VFP

Dans l'objectif de pouvoir à la fois moduler le diamètre des vaisseaux et de pouvoir dans un deuxième temps, les enrichir avec d'autres types cellulaires, nous avons encore plus raffiné l'approche en mettant au point un double VFP au sein du même canal. L'idée a consisté à réaliser le processus de VFP une première fois avec du milieu de culture contenant ou non des cellules, déposant ainsi une première couche de collagène I, puis à répéter ce procédé avec la suspension cellulaire d'HUVEC, formant de cette manière le vaisseau final au sein d'une deuxième couche de collagène (Figure 3-33).

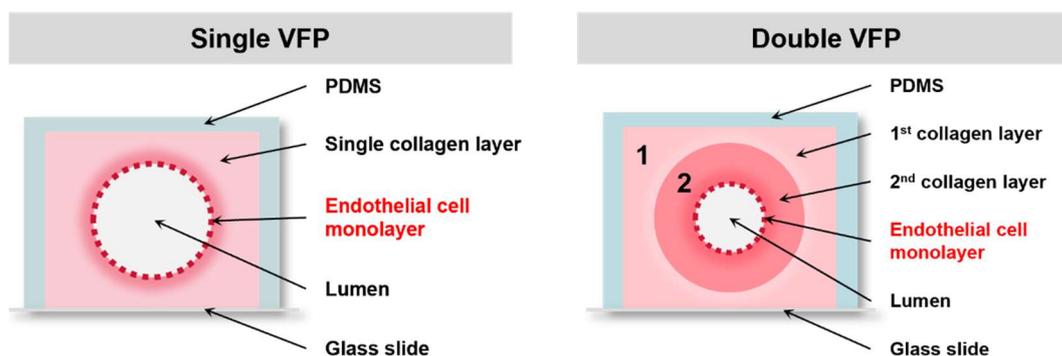


Figure 3-33 Présentation schématique des procédés de simple et double VFP

Nos premiers essais de double VFP ont rapidement montré que le lumen s'élargissait en sortie de canal dans ces conditions. Cela est dû au fait que la largeur du lumen obtenu *via* VFP dépend de la vélocité du fluide le moins visqueux qui déplace le fluide le plus visqueux. Plus sa vélocité est élevée, plus le lumen est fin et inversement [151]. Ici, la vélocité de la suspension cellulaire, qui est le fluide le

moins visqueux, est déterminée par la différence de pression négative entre l'entrée et la sortie du canal [157] (Équation 11).

$$Q = \frac{\Delta P}{R_h(L)}$$

Équation 11 : Q : débit du fluide au sein du canal ; ΔP : différence de pression entre l'entrée et la sortie ; L : longueur du canal ; R<sub>h</sub> : résistance hydraulique, proportionnelle à L.

Or, lorsqu'un fluide se déplace au sein d'un canal microfluidique, il subit des pertes de charges et sa pression locale diminue au fur et à mesure qu'il progresse [236]. Le front de formation du lumen aura donc tendance à s'élargir à mesure qu'il s'approche de la sortie du canal. Alors qu'un léger élargissement ne représentait pas un problème dans le cas du simple VFP (quelques μm), pour le double VFP, il conduisait à une variation de section de plus de 30% du lumen (Figure 3-34).

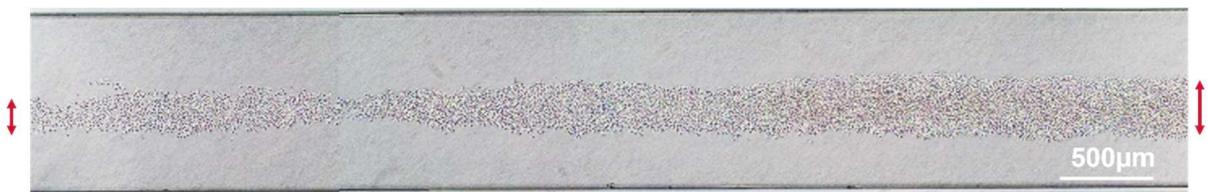


Figure 3-34 Elargissement du lumen le long du canal après le processus de double VFP

Cette géométrie variable aurait entraîné des variations indésirables des forces de cisaillement dans le vaisseau lors de la future mise en flux [161], [162]. Nous avons donc voulu contrecarrer ce problème qui n'est pas adressé dans la littérature. Pour cela, nous avons suivi le raisonnement suivant : si le premier VFP crée un lumen plus large en sortie et que nous procédons de la même manière pour le second VFP, la différence de section entre le début du lumen et la fin sera alors encore accentuée, contrairement à ce qui est souhaité (Figure 3-35). En revanche, si l'on permute l'entrée et la sortie de la puce après le premier VFP et que l'on réalise un second VFP dans ce sens, alors l'effet d'élargissement du premier et du second VFP devraient théoriquement se compenser et une section quasi-constante du lumen en résulter.

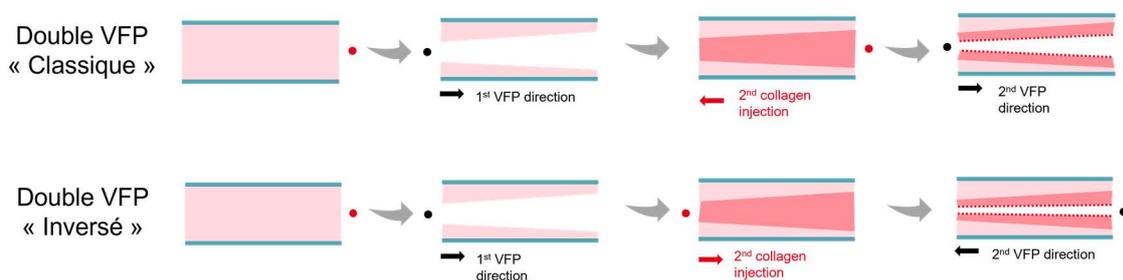


Figure 3-35 Schéma de principe du double VFP inversé

Nous avons vérifié cette idée expérimentalement dans nos puces microfluidiques. En permutant la sortie et l'entrée du canal pour réaliser le deuxième VFP, l'élargissement généré par la perte de charge dans le canal a été effectivement compensé et a permis de créer des vaisseaux à lumen de diamètre relativement constant sur toute la longueur (Figure 3-36). Des mesures de diamètre

effectuées le long de lumen de vaisseaux formés par double VFP classique ou inversé confirment cette observation (Figure 3-37).



Figure 3-36 Lumen obtenu après le processus de double VFP inversé

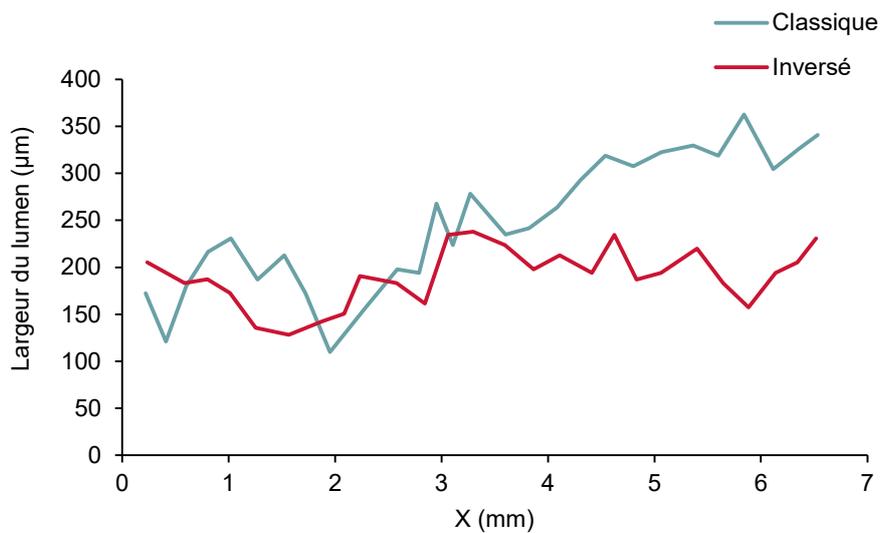


Figure 3-37 Comparaison du profil géométrique du lumen le long du canal microfluidique pour un double VFP classique ou inversé.

Nos deux approches de VFP (simple et double inversé) ont ainsi permis de produire des vaisseaux sur puce de diamètre variables en fonction des dispositifs utilisés et recouverts d'une monocouche de cellules endothéliales. Après marquage des jonctions cellulaires et des noyaux, ces vaisseaux ont été visualisés par imagerie confocale (Figure 3-38) et leurs dimensions ont été caractérisées (Tableau 3-3).

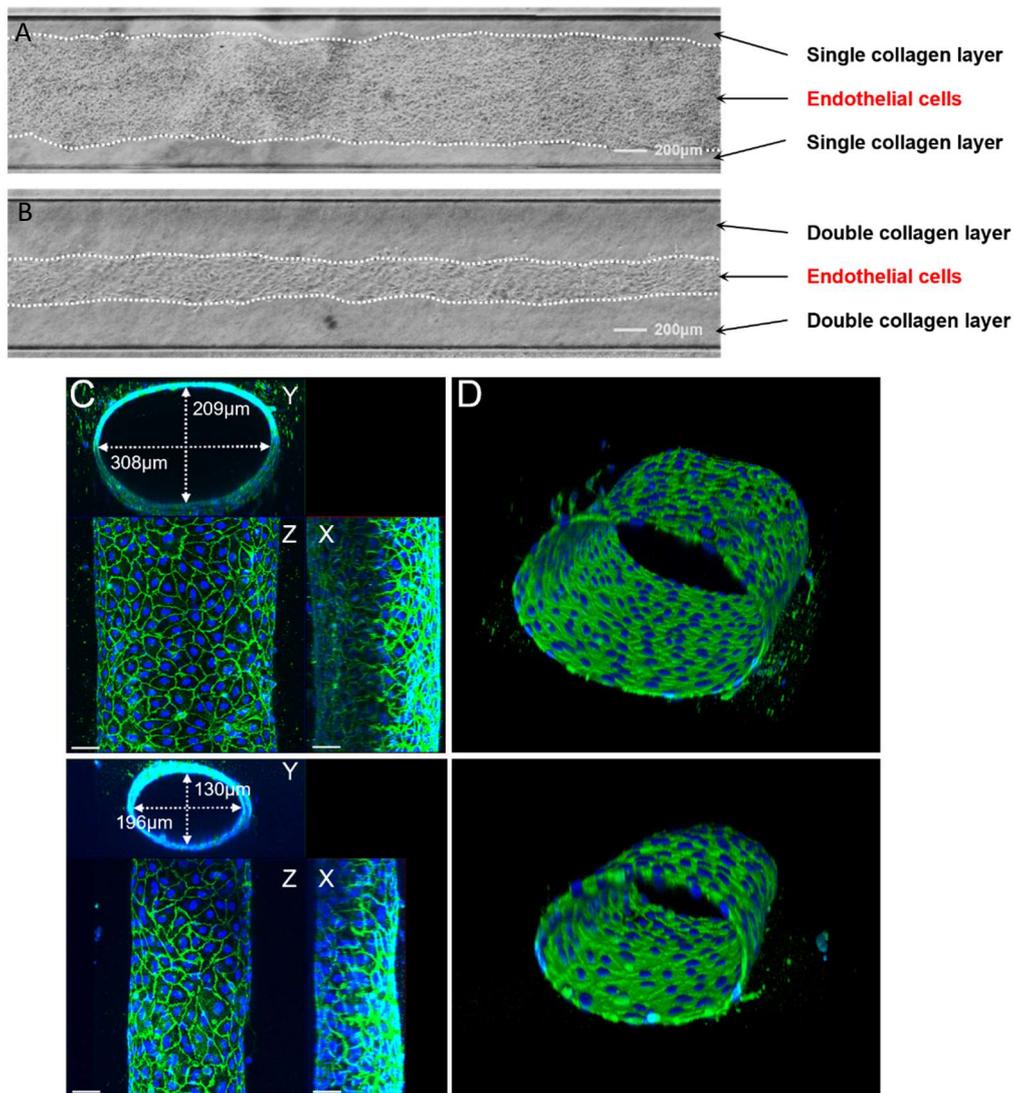


Figure 3-38 Images en contraste de phase des vaisseaux obtenus par simple (A) ou double VFP (B) dans une puce de largeur 1mm, et imagerie confocale (C) des vaisseaux obtenus par simple (haut) ou double VFP (bas) dans une puce de largeur 400µm (projection sur les axes X, Y et Z), et reconstruction 3D des vaisseaux (D)

Tableau 3-3 Caractérisation de la largeur des lumens obtenus par simple ou double VFP dans des puces de 400µm de largeur et de 1mm

Microchannel	Single VFP	Double VFP
<b>400µm</b>	351 ± 31µm (n=20)	266µm ± 54µm (n=17)
<b>1000µm</b>	700 ± 54µm (n=35)	505 ± 84µm (n=28)

Nous avons donc bien obtenu des vaisseaux de sections différentes comme attendu, grâce aux procédés de simple ou de double VFP.

Ces vaisseaux sur puces étaient formés d'une monocouche de cellules endothéliales confluentes après environ 24h et étaient perfusables. En effet, lors des changements de milieu de culture quotidiens, on pouvait clairement voir la circulation du milieu d'une entrée à l'autre. De plus, des

débris cellulaires circulaient visiblement dans les lumens. D'un point de vue structurel, nous avons constaté que la forme des vaisseaux n'était pas parfaitement circulaire mais plutôt ovale.

### ***3.1.2.6 Bilan de l'approche de viscous finger patterning***

Dans cette section, nous avons mis au point les conditions de création d'une structure 3D de collagène I *via* la technique de VFP. Nous avons choisi de travailler avec des puces microfluidiques de 400µm x 400µm x 9mm et de 300µm x 1mm x 9mm (hauteur x largeur x longueur) fabriquées à partir de moules au format SBS 96-puits. L'ensemencement des cellules combiné au processus de VFP et l'optimisation de la suspension cellulaire avec l'ajout de dextran ont permis une répartition homogène des cellules endothéliales dans le canal. Les vaisseaux sur puce ainsi créés étaient perfusables et pouvaient être maintenus en culture pendant plusieurs jours. De plus, l'approche a encore été raffinée avec la mise au point du double VFP qui nous a donné la capacité de créer des vaisseaux de largeurs variables par l'apposition d'une seconde couche concentrique de collagène dans le canal.

Cette technique demande peu d'instrumentation et elle est rapide à mettre en œuvre, robuste et reproductible. Nous avons pu produire jusqu'à 96 vaisseaux à la fois par expérience, cela répond donc au critère de compatibilité avec le moyen/haut débit. Dans la partie de validation biologique suivante, tous les vaisseaux sur puce ont été générés en utilisant ces approches de VFP.

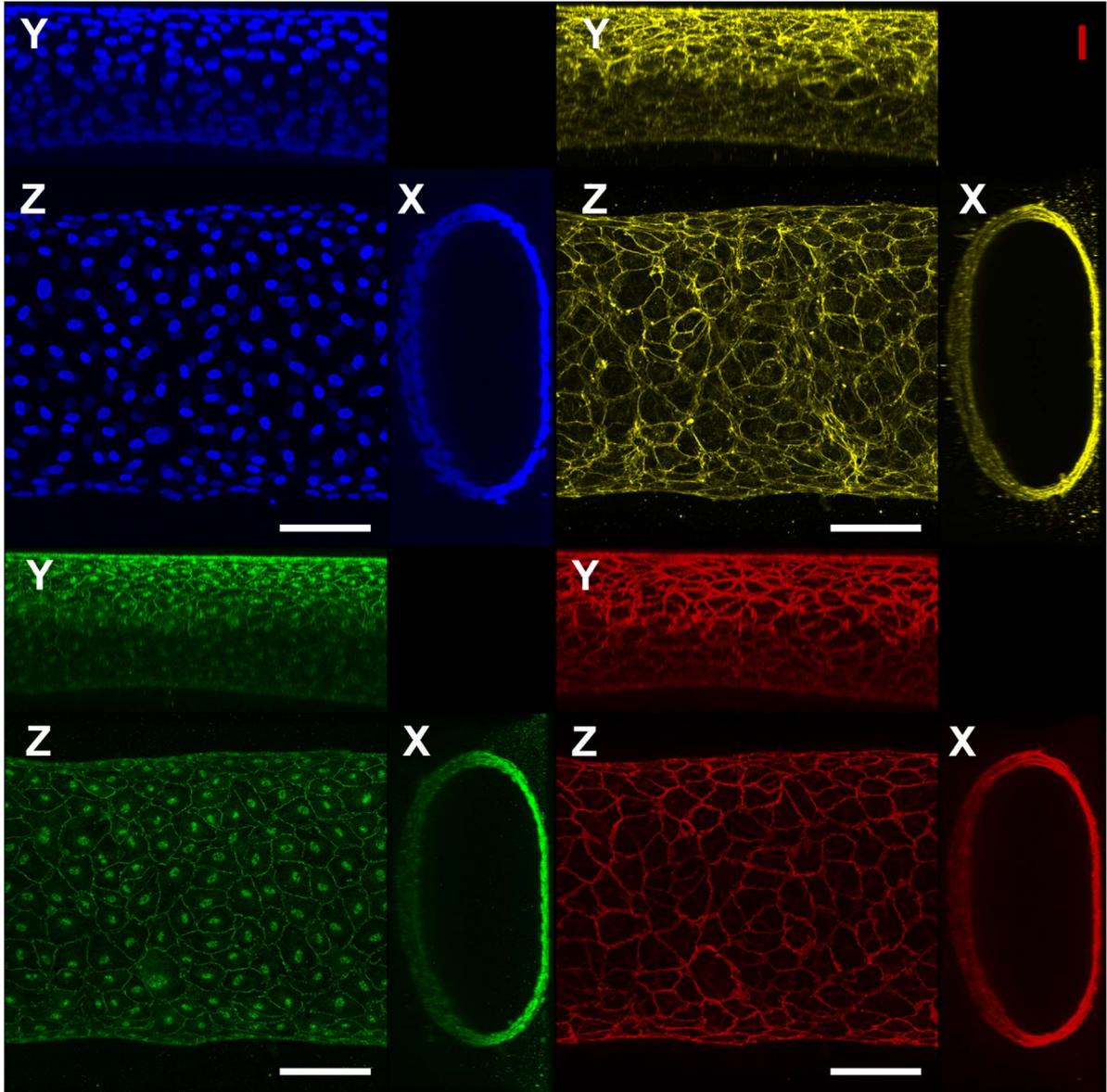
## 3.2 VALIDATION BIOLOGIQUE DES VAISSEAUX SUR PUCE ET RAFFINEMENT

---

Après avoir mis au point la fabrication des vaisseaux sur puces formés d'une monocouche endothéliale dans un gel de collagène I, perfusables et viables en culture pendant plusieurs jours, nous nous sommes attachés à valider leur pertinence biologique et leurs fonctionnalités. Pour cela nous avons tout d'abord examiné l'intégrité de la monocouche endothéliale par la visualisation des jonctions intercellulaires et de la répartition en monocouche cellulaire. D'autre part, les réponses en activation inflammatoire et en perméabilité des vaisseaux sur puce ont été étudiées. Cette section présente également comment notre modèle a été enrichi pour intégrer une couche cellulaire supplémentaire dans le but de reproduire des vaisseaux plus complexes et plus proches structurellement des vaisseaux naturels. Enfin, nous avons exploré des possibilités de diversifications du modèle, notamment en utilisant des cellules endothéliales de poumon et de foie.

### 3.2.1 Intégrité de la monocouche endothéliale

Afin de visualiser les cellules et d'évaluer la qualité des structures vasculaires créées, des marquages par immunofluorescence des jonctions cellulaires et du cytosquelette d'actine ont été réalisés et imagés par microscopie confocale. Pour cela, la VE-cadhérine, un marqueur spécifique et constitutif de la jonction adhérente de l'endothélium [171], a été marquée. D'autre part, afin de détecter la jonction serrée, nous avons choisi de visualiser Zona Occludens-1 (ZO-1). Premièrement, ces marquages ont montré que les cellules endothéliales formaient bien une monocouche jointive à l'intérieur du lumen de collagène de ces vaisseaux. Deuxièmement, une distribution continue des deux types de jonctions intercellulaires au sein de la monocouche des vaisseaux a été systématiquement constatée (Figure 3-39), ces deux observations étant en accord avec la morphologie et la répartition des jonctions connues pour un endothélium classique [173]. D'un point de vue technique, la conception des puces microfluidiques a permis d'imager les vaisseaux dans toute leur épaisseur et ainsi réaliser de la reconstruction 3D après microscopie confocale.



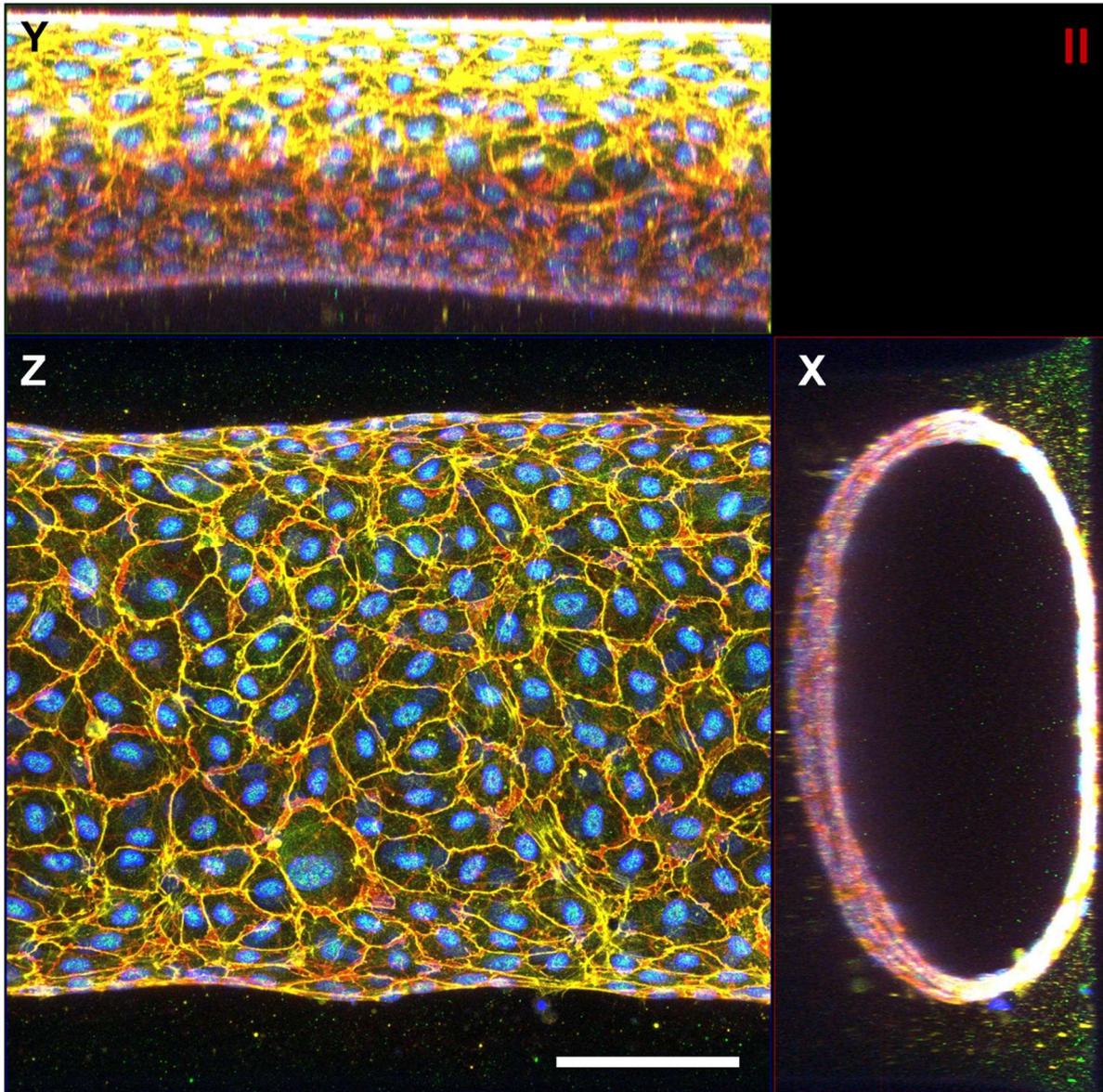
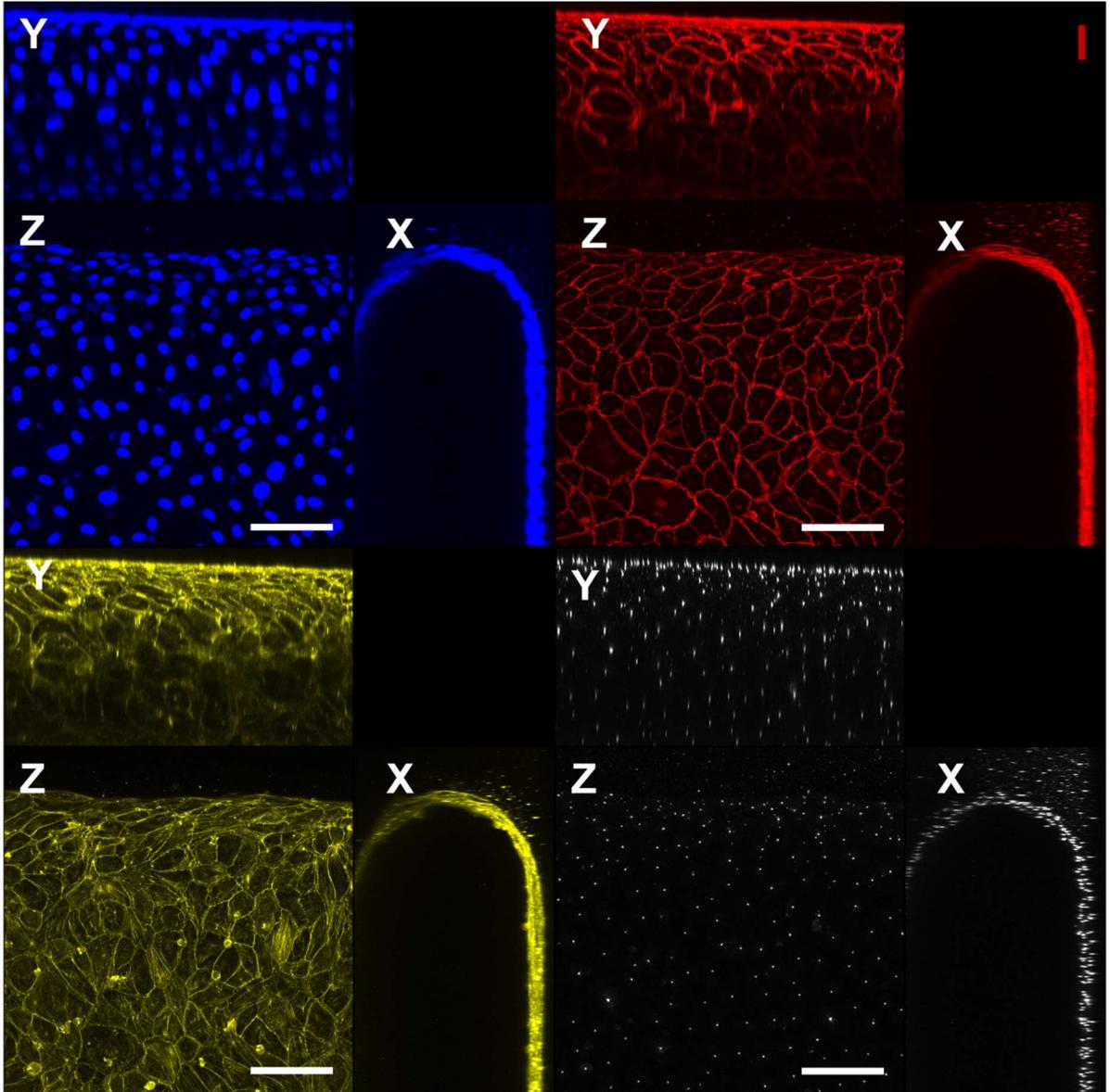


Figure 3-39 Imagerie confocale d'un vaisseau sur puce dans un canal de 400 $\mu$ m après immunomarquage des noyaux (DAPI, bleu), des filaments d'actine (phalloïdine, jaune), des jonction serrées (ZO-1, vert) et des jonctions adhérentes (VE-cadhérine, rouge). Projection sur les axes X, Y et Z. Couleurs séparées (I) et couleurs fusionnées (II). Barre= 100 $\mu$ m

Dans l'objectif d'étudier l'influence du flux sur l'orientation des cellules endothéliales dans les vaisseaux sur puce, nous avons également mis au point un marquage de la péricentrine, une protéine faisant partie du centre cellulaire organisateur des microtubules (*Microtubule Organizing Center*) et qui permet de visualiser l'orientation des cellules endothéliales soumises aux forces de cisaillement dans un flux [237] (Figure 3-40). Celle-ci a bien été détectée sur l'ensemble des cellules endothéliales dans les vaisseaux sur puce.



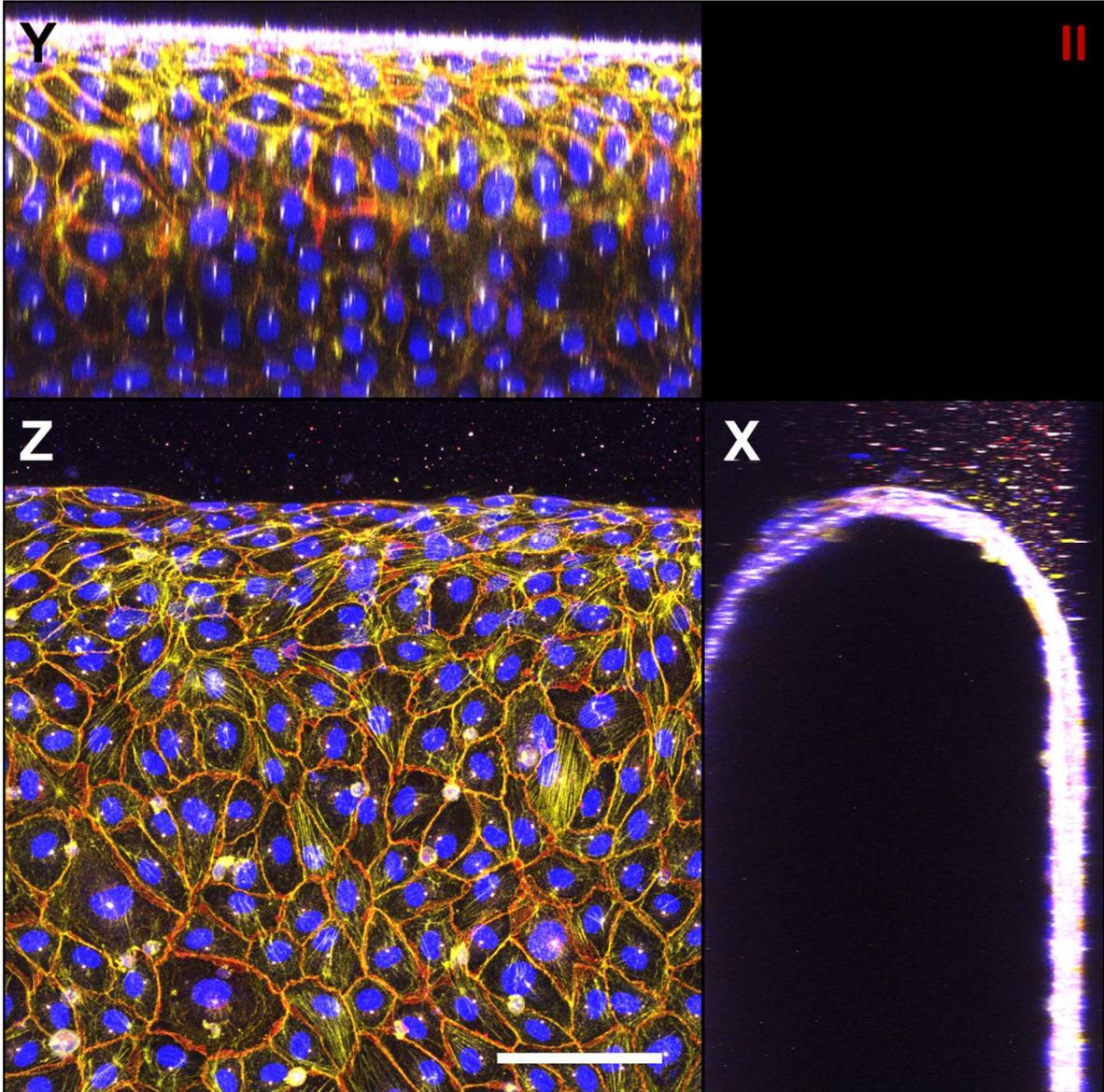


Figure 3-40 Imagerie confocale d'un vaisseau sur puce dans un canal de 1mm après immunomarquage des noyaux (DAPI, bleu), des filaments d'actine (phalloïdine, jaune), des jonctions adhérentes (VE-cadhérine, rouge) et du centre cellulaire organisateur des microtubules (péricentrine, blanc). Projection sur les axes X, Y et Z. Couleurs séparées (I) et couleurs fusionnées (II). Barre= 100 $\mu$ m

### 3.2.2 Réponse en activation inflammatoire

Un des rôles fondamentaux de la barrière vasculaire est de permettre l'infiltration des cellules immunitaires circulantes dans les tissus inflammés [238]. Afin d'évaluer si les vaisseaux sanguins fabriqués présentaient effectivement une telle réponse à des cytokines pro-inflammatoires, ceux-ci ont été stimulés par du TNF $\alpha$  injecté dans les lumières des vaisseaux *via* les entrées fluidiques.

#### 3.2.2.1 Analyse fonctionnelle de la réponse

Tout d'abord, la réponse fonctionnelle a été évaluée par l'injection de monocytes humains THP-1 marqués à la calcéine AM par voie intraluminaire et visualisation de leur adhérence à l'endothélium. En contrôle de ces expériences, des HUVEC cultivées sur plastique en 2D ont été traitées de la même manière. Pour les vaisseaux sur puces comme pour les contrôles 2D, l'adhérence des monocytes THP-1 aux cellules endothéliales non stimulées s'est avérée négligeable, alors qu'après stimulation par TNF $\alpha$ , un nombre important de THP-1 a adhéré à la surface des endothéliales (Figure 3-41).

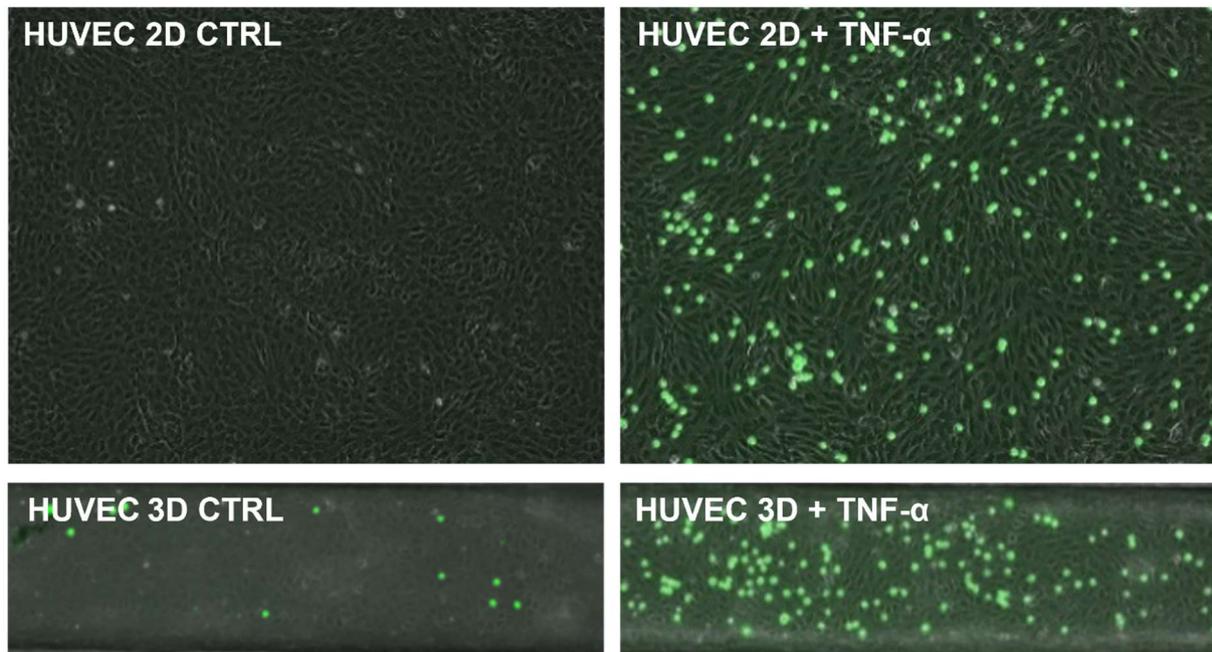


Figure 3-41 Comparaison de la réponse en activation d'un endothélium en 2D dans une plaque de culture et d'un endothélium 3D dans nos vaisseaux sur puce en canal de 400 $\mu$ m. Les vaisseaux ont été stimulés ou non avec 10ng/ml de TNF $\alpha$  pendant 4h, puis des monocytes (THP-1) marqués à la calcéine AM (vert) ont été injectés dans les lumens ou les puits de culture et incubés sur la face luminale de l'endothélium.

En parallèle du TNF $\alpha$ , nous avons stimulé les vaisseaux sur puce avec de l'IL1- $\beta$ , qui a également une activité pro-inflammatoire pour les cellules endothéliales [239] et de l'IL-6. Comme dans le cas du TNF $\alpha$ , l'IL1- $\beta$  a induit l'adhérence d'un large nombre de monocytes (Figure 3-42) et, comme attendu, aucune adhérence de cellules immunitaires n'a été observée lorsque les vaisseaux sanguins ont été stimulés par l'IL-6. Ceci correspond au fait que les HUVEC n'expriment pas le récepteur de l'IL-6, gp80 [240]. Une numération des cellules adhérentes dans ces différentes conditions, réalisée à partir d'images de microscopie à fluorescence, a permis d'évaluer quantitativement la réponse fonctionnelle des vaisseaux sur puce sur toute la longueur du canal (Figure 3-43).

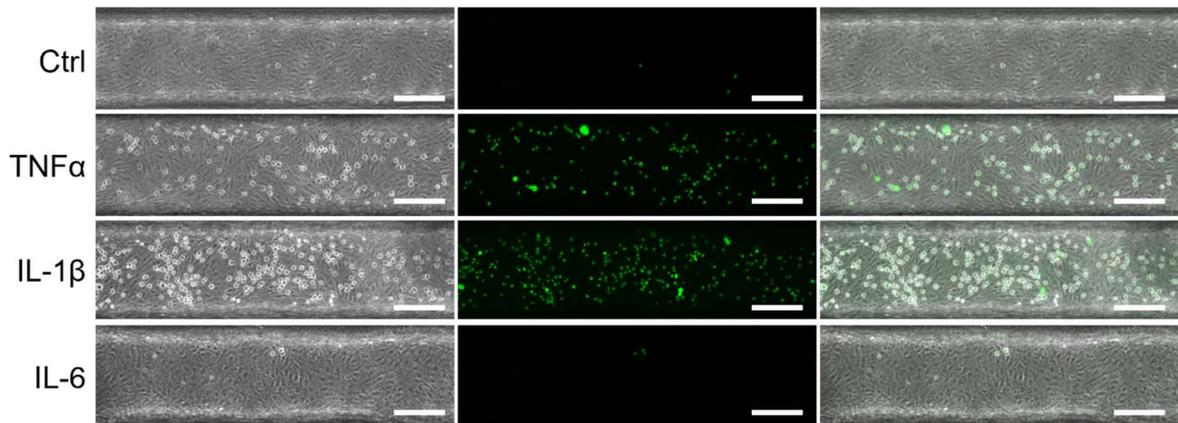


Figure 3-42 Adhérence des cellules immunitaires aux cellules endothéliales dans les vaisseaux sur puces activés. Les vaisseaux ont été stimulés ou non avec 10ng/ml de TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  ou IL-6 pendant 4h, puis des monocytes (THP-1) marqués à la calcéïne AM (vert) ont été injectés dans les lumens et laissés à adhérer sur la face luminale de l'endothélium, gauche : contraste de phase, milieu : imagerie en fluorescence, droite : images fusionnées, barre=200 $\mu$ m.

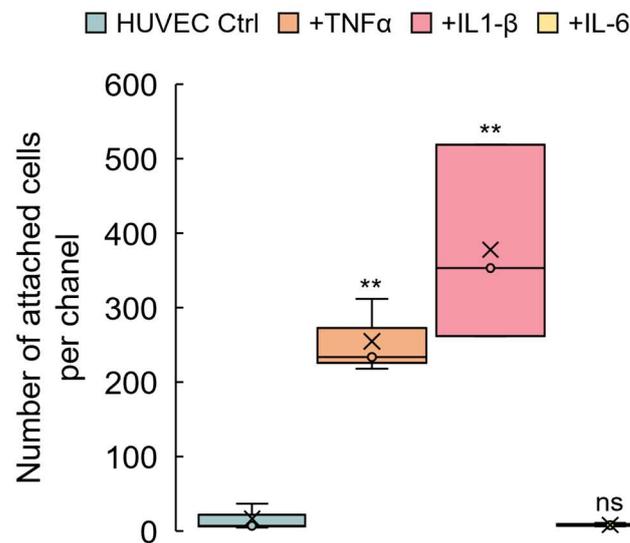


Figure 3-43 Quantification sur tout le canal du nombre de cellules immunitaires attachées aux parois des vaisseaux, n=3. \*P<0,05, \*\*P<0,01, ns ; non significatif comparé au Ctrl

La visualisation des THP-1 adhérentes aux cellules endothéliales des vaisseaux inflammés par microscopie confocale et reconstruction 3D permet d'apprécier leur localisation. La majorité des cellules immunes adhère à la partie inférieure des vaisseaux, ce qui correspond très probablement à la sédimentation des cellules dans le lumen lors de la période d'adhérence (Figure 3-44).

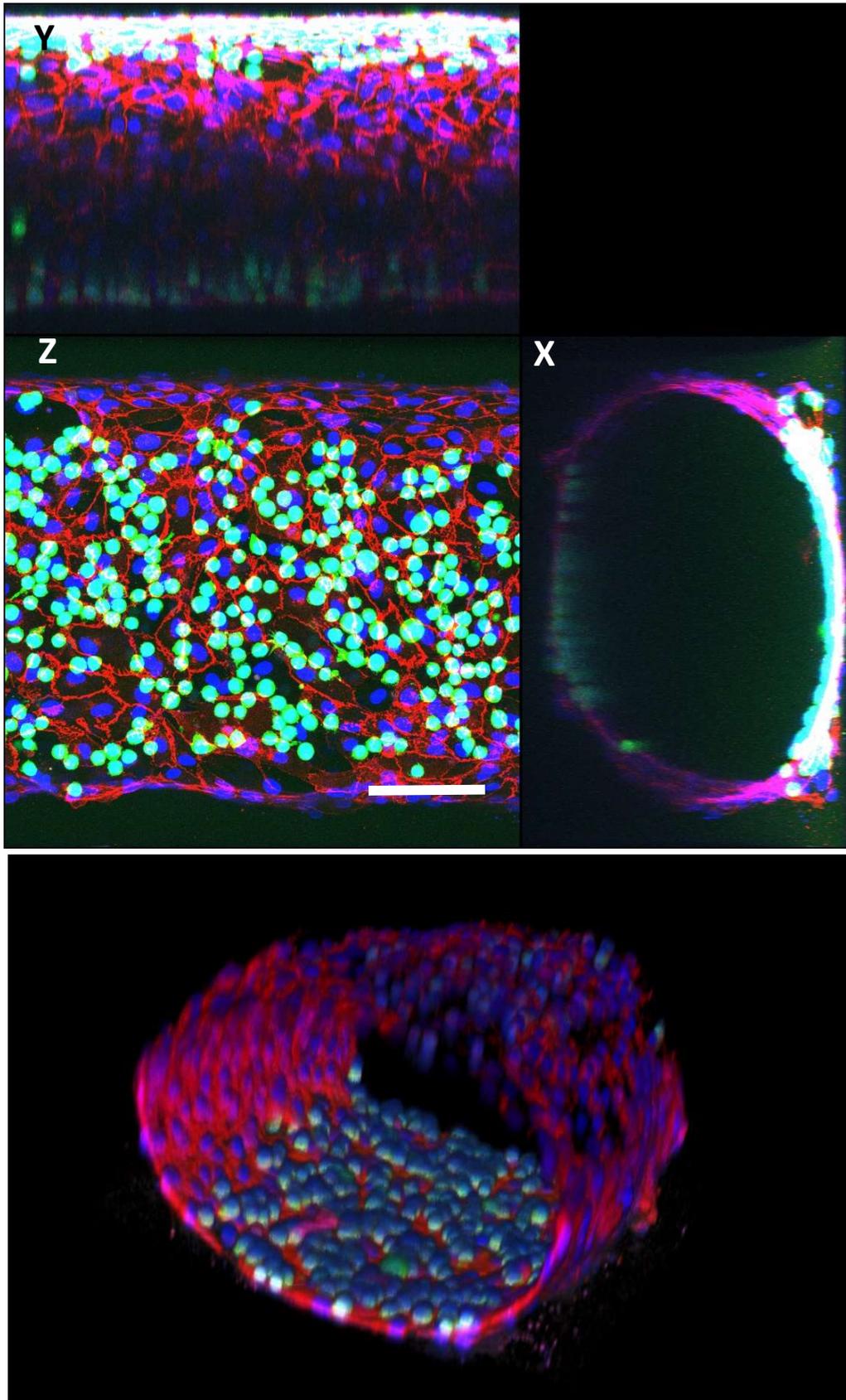


Figure 3-44 Imagerie confocale de l'adhérence des cellules immunitaires aux cellules endothéliales dans un vaisseau stimulé avec 10ng/ml d'IL1- $\beta$  pendant 4h. Marquage de la jonction adhérente VE-cadhérine (rouge), des noyaux en DAPI (bleu) et des THP-1 en calcéïne (vert). Barre = 100 $\mu$ m

En conclusion de ces différentes observations, il est, d'une part, important de noter que le procédé de fabrication des vaisseaux sur puce n'a pas entraîné une activation spontanée des cellules endothéliales car celles-ci n'étaient pas activées dans les vaisseaux non stimulés. Le processus d'établissement du vaisseau et les conditions de culture ont donc permis la formation d'un endothélium normal et quiescent, tel que celui des tissus non inflammés. D'autre part, ces vaisseaux sur puce ont bien présenté une réponse fonctionnelle significative aux cytokines pro-inflammatoires, comme dans un vaisseau inflammé.

### 3.2.2.2 Analyse transcriptionnelle de la réponse au TNF $\alpha$

Au-delà de la réponse fonctionnelle des vaisseaux sur puce aux cytokines pro-inflammatoires, nous avons poursuivi cette analyse en vérifiant leur réponse transcriptionnelle, par l'analyse de gènes connus pour être régulés au cours de l'inflammation vasculaire. La possibilité de faire des analyses moléculaires pour comprendre les processus se produisant dans les dispositifs d'organes sur puce apporte une grande valeur ajoutée à ces modèles. Nous avons mis au point l'extraction et la purification d'ARN totaux à partir de vaisseaux sur puce uniques, puis réalisé l'évaluation quantitative des niveaux d'expression de gènes dans les cellules endothéliales à l'aide d'approches RT-qPCR basées sur la technologie Taqman. A titre d'exemple, l'expression d'ICAM-1, VCAM-1 & E-sélectine (SELE) a été évaluée dans des cellules endothéliales récupérées à partir de vaisseaux sanguins indépendants qui avaient été stimulés ou non avec du TNF $\alpha$ . Ces gènes sont connus pour être significativement régulés à la hausse dans les cellules endothéliales suite à la stimulation par des cytokines pro-inflammatoires [239]. Les niveaux d'expression de SELE, ICAM-1 et VCAM-1 ont effectivement montré une augmentation de respectivement  $138 \pm 51$ -,  $130 \pm 94$ - et  $850 \pm 171$  fois suite à la stimulation avec du TNF $\alpha$  et par rapport aux vaisseaux non stimulés (Figure 3-45). En outre, nous avons approfondi l'analyse de ces extraits en quantifiant les niveaux d'expression de plusieurs dizaines d'autres gènes sur des *Taqman Array Cards* (Figure 3-46). Parmi les gènes typiquement régulés à la hausse ou à la baisse par le TNF $\alpha$  dans HUVEC et en plus de ceux analysés ci-dessus, les vaisseaux sur puce ont montré une augmentation significative des niveaux d'expression de CCL2, CX3CL1, ICAM-1 et une diminution significative des niveaux d'expression de ACE, FLT1, KDR, NOS3, NRP1, OCLN, TEK et THBD, en excellente corrélation avec les études précédentes utilisant les HUVEC dans des conditions de culture 2D [241]–[246].

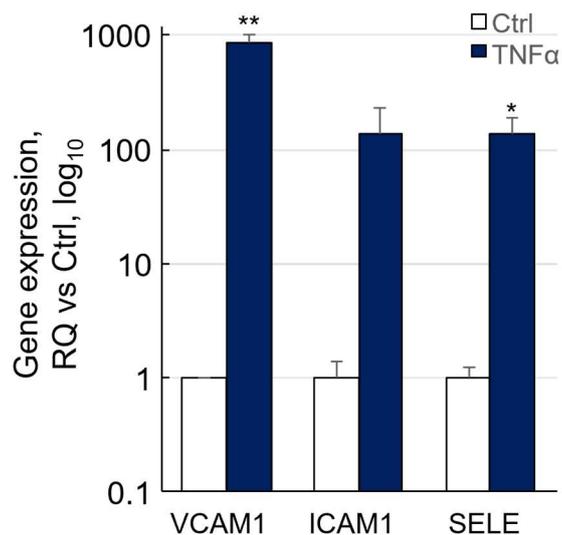


Figure 3-45 Analyse par RT-qPCR de l'expression de gènes dans les cellules endothéliales récupérées à partir de vaisseaux uniques après stimulation (TNFα) ou non (Ctrl) avec 10ng/ml de TNFα pendant 4h. n=4 \*P<0,05, \*\*P<0,01, ns ; non significatif, comparé au Ctrl. RQ; quantité relative.

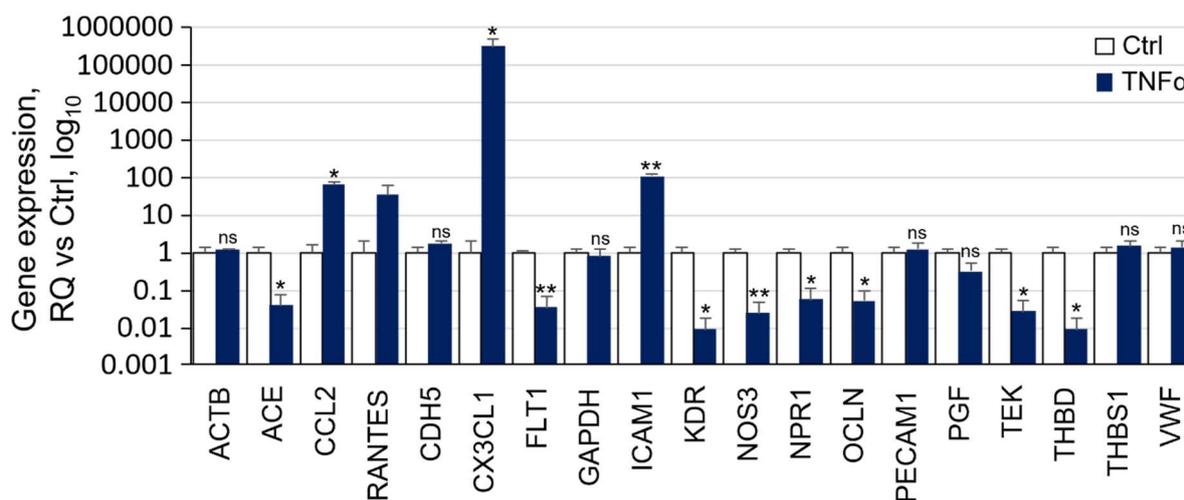


Figure 3-46 Analyse par Taqman Array Cards de l'expression de gènes après l'extraction des cellules de vaisseaux sur puces indépendants stimulés pendant 4h avec 10ng/ml de TNFα (TNFα) ou non (Ctrl), seule une sélection de gènes est présentée, n=4, \*P<0,05, \*\*P<0,01, ns ; non significatif, comparé au Ctrl. RQ; quantité relative.

### 3.2.2.3 Application préliminaire à l'extravasation métastatique

La dissémination métastatique des cancers et, notamment, l'extravasation des cellules tumorales circulantes et leur entrée dans les tissus, exploite certains des récepteurs d'adhérence des leucocytes à la surface des cellules endothéliales [247], [248]. Après l'introduction de cellules de cancer du sein MDA-DB-231 dans la lumière des vaisseaux dans les conditions utilisées précédemment avec les cellules immunitaires, celles-ci ont adhéré aux vaisseaux stimulés au TNFα et beaucoup moins aux vaisseaux non stimulés (Figure 3-47 et Figure 3-48)

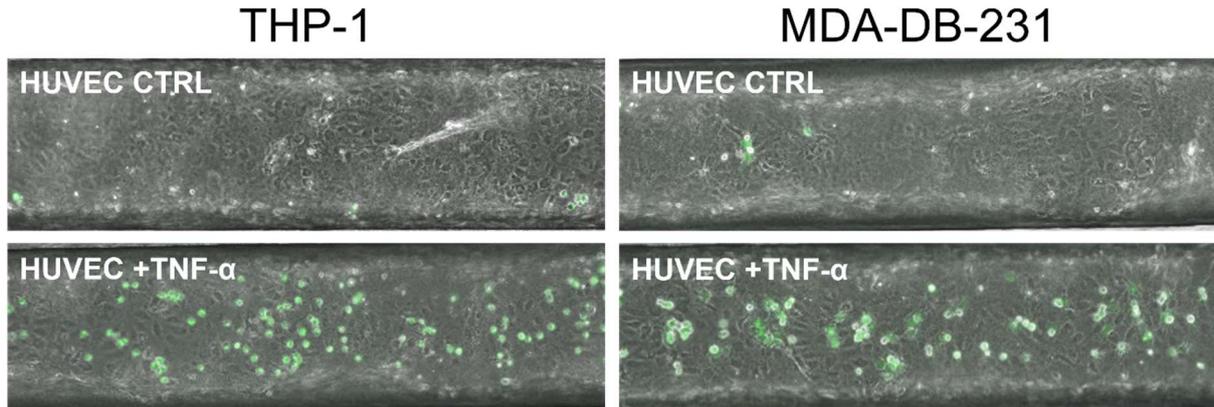


Figure 3-47 Adhérence de cellules immunitaires THP-1 (gauche) et des cellules cancéreuses mammaires MDA-DB-231 (droite) aux cellules endothéliales HUVEC dans les vaisseaux sur puces. Les vaisseaux ont été stimulés (+TNF- $\alpha$ ) ou non (CTRL) avec 10ng/ml de TNF $\alpha$  pendant 4h au préalable à l'injection des cellules circulantes.

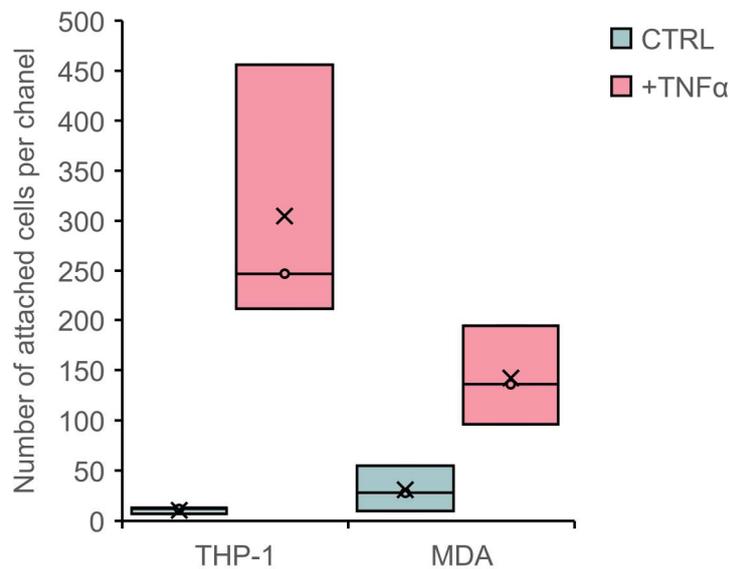


Figure 3-48 Comparaison de l'attachement de cellules de l'immunité THP-1 et de cellules cancéreuses mammaires MDA-DB-231 (MDA) lorsque que l'endothélium du vaisseau sur puce est stimulé (+TNF $\alpha$ ) ou non (CTRL) avec du TNF $\alpha$  en canal de 400 $\mu$ m, n=4.

L'analyse par microscopie confocale de la localisation des cellules cancéreuses au sein de ces vaisseaux après 16h montre que celles-ci ont commencé leur extravasation et se sont intégrées à l'endothélium (Figure 3-49). La sédimentation des MDA-DB-231 ayant entraîné leur adhérence principalement à la face inférieure des vaisseaux au contact de la lamelle de verre, il n'a pas été possible d'estimer si ces cellules auraient pu poursuivre leur migration au-delà de l'endothélium dans la couche de collagène représentant le tissu environnant.

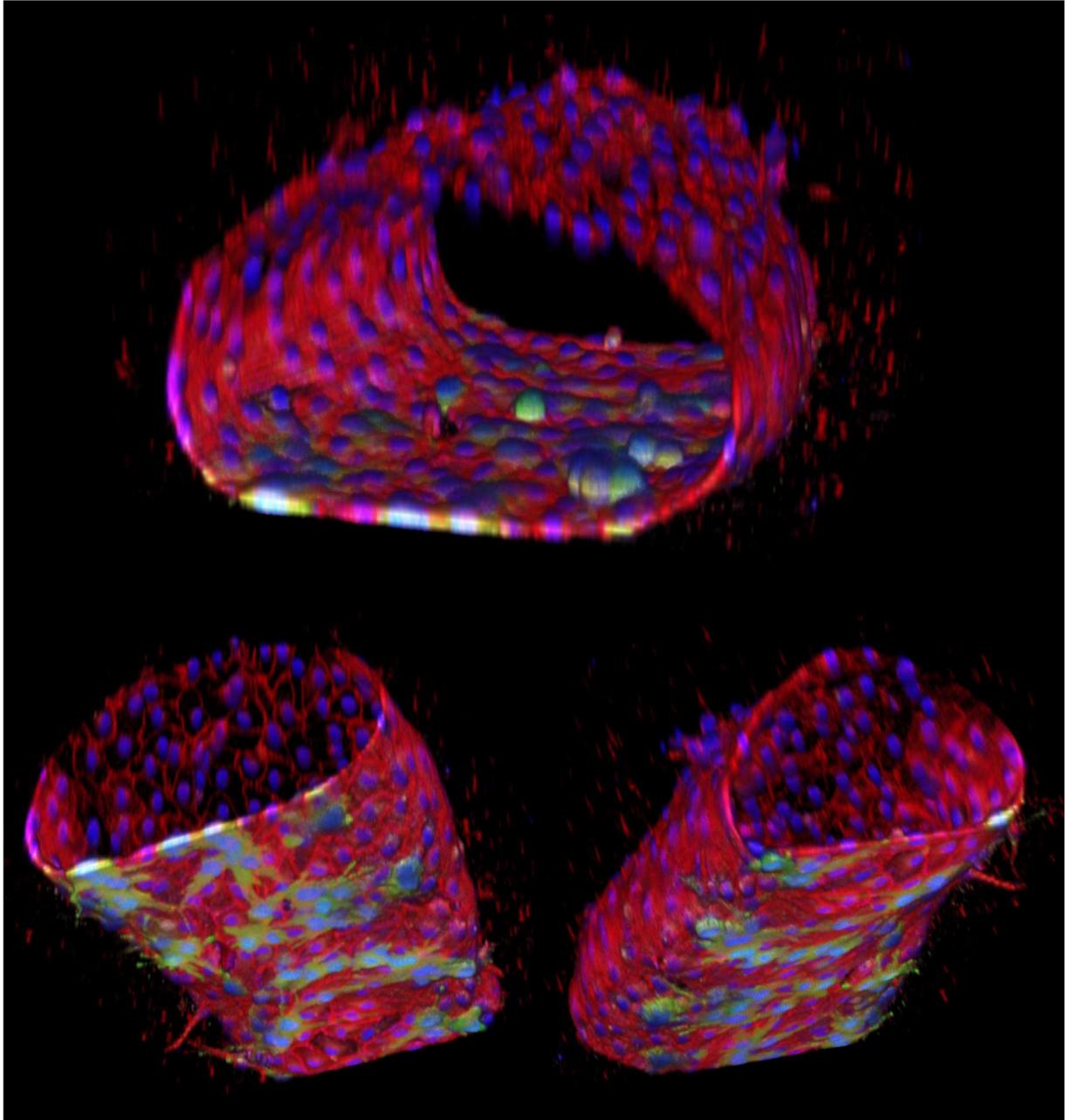


Figure 3-49 Reconstruction 3D par imagerie confocale de l'adhérence de cellules cancéreuses MDA-DB-231 aux cellules endothéliales dans un vaisseau activé au TNF $\alpha$  (10ng/ml pendant 4h) dans une puce de 400 $\mu$ m. Marquage de la jonction adhérente (VE-cadhérine, rouge), des noyaux (DAPI, bleu) et des MDA-DB-231 (calcéine AM, vert).

En conclusion de ces analyses, les vaisseaux sanguins sur puces fabriqués au cours de ce projet sont fonctionnels en réponse à l'inflammation et pourront servir de modèle d'étude aux phénomènes liés à l'activation des cellules endothéliales, notamment la réaction immunitaire et la dissémination métastatique.

### 3.2.3 Réponse en perméabilité vasculaire

Une autre fonction essentielle de l'endothélium est son rôle de barrière physique et sélective entre le sang et les organes. L'intégrité de la barrière endothéliale est assurée par les jonctions adhérentes spécifiques et par les jonctions serrées. L'ouverture transitoire de cette barrière permet la diffusion de métabolites du sang vers les tissus environnants et constitue une des origines de l'œdème inflammatoire [249]. L'intégrité de l'endothélium des vaisseaux sur puce et leur réactivité aux stimuli de perméabilité ont été évaluées en adaptant l'approche classique des tests de perméabilité d'un endothélium à un dextran fluorescent [123], [250]. Ainsi, du dextran 70kDa-FITC a été injecté dans la lumière des vaisseaux et sa diffusion à travers la couche endothéliale vers le gel de collagène a été suivie par vidéo microscopie en temps réel. Les coefficients de diffusion ont été calculés à partir de l'analyse des images de fluorescence.

Afin de stimuler ces vaisseaux avec un vaso-perméant naturel, ces vaisseaux ont été traités avec des quantités croissantes de thrombine [200]. L'absence de cellules endothéliales a entraîné une diffusion très rapide du dextran dans la couche de collagène, alors que la présence de la monocouche endothéliale a considérablement ralenti cette diffusion, indiquant que l'endothélium de ces vaisseaux constituait bien une barrière relativement efficace (Figure 3-50). Une stimulation de ces vaisseaux avec des quantités croissantes de thrombine de 10 à 50 u/ml a provoqué une augmentation correspondante de la diffusion du dextran hors du lumen.

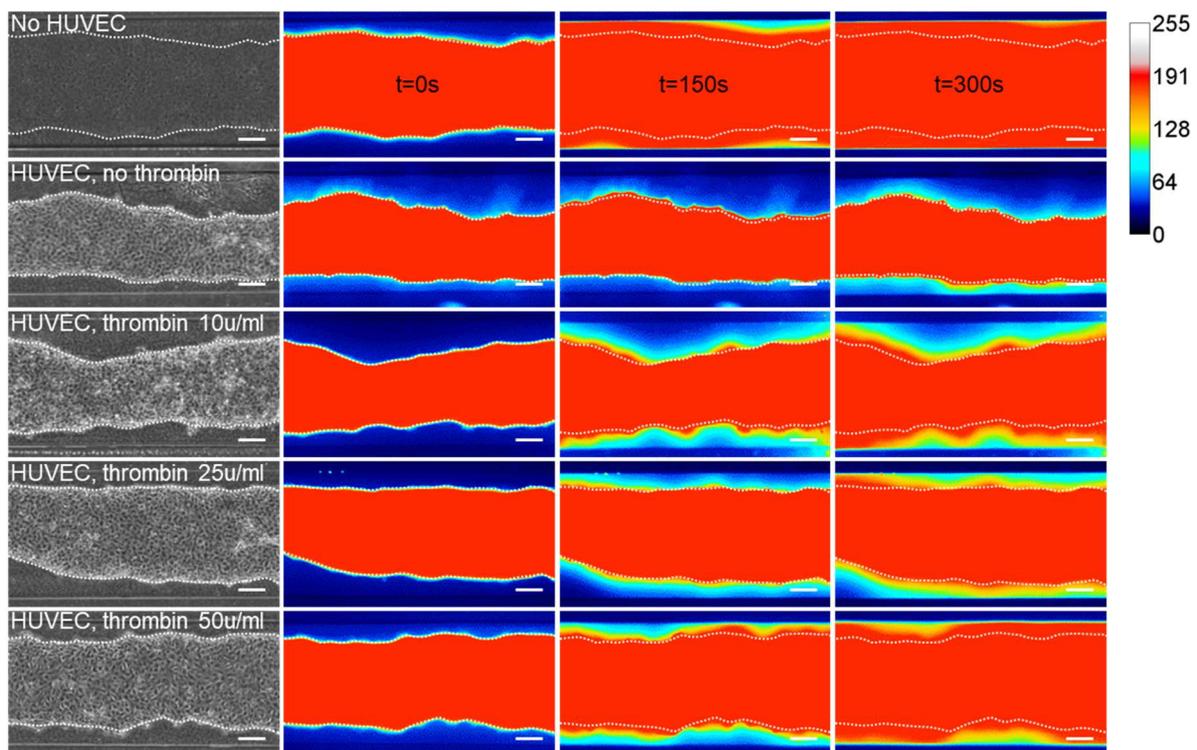


Figure 3-50 Diffusion de dextran 70kDa-FITC dans la couche de collagène en fonction du temps et de la dose reçue de thrombine (thombin). No HUVEC : canal collagène non tapissé de cellules endothéliales, HUVEC : canaux bordés de cellules endothéliales, n=3 microvaisseaux par condition, barre = 200 $\mu$ m. Les microcanaux utilisés avaient une largeur de 1000 $\mu$ m. Les images ont été extraites d'enregistrements vidéo à t=0, 150s ou 300s après injection de dextran 70kDa-FITC.

Afin de mesurer quantitativement cette diffusion, nous avons effectué une analyse d'images à partir d'enregistrements de vidéo microscopie en temps réel. Ceux-ci ont été réalisés sur des périodes

de 5 min après l'injection de Dextran-FITC dans les lumières des vaisseaux (Figure 3-51). Une macro Image J a été créée spécifiquement pour calculer les coefficients de perméabilité diffusives ( $P_d$ ) dans ces vaisseaux. Elle a consisté à quantifier la diffusion du dextran en mesurant les variations d'intensités de fluorescence dans le collagène [123], [251]. Les résultats ont montré que les lumières de collagène non tapissées de cellules endothéliales avaient le  $P_d$  calculé le plus élevé ( $1,09 \cdot 10^{-4}$  cm/s) alors que la présence d'un endothélium confluent abaissait ce coefficient à  $0,10 \cdot 10^{-4}$  cm/s. Les traitements des vaisseaux revêtus d'un endothélium avec des quantités croissantes de thrombine ont induit une réponse graduelle en termes de perméabilité mesurée, comme le montrent les coefficients calculés (Figure 3-52). Notre méthode a donc non seulement permis de suivre la perméabilité des colorants fluorescents en temps réel à l'aide de la microscopie vidéo mais a également permis de quantifier avec précision les paramètres de diffusion à tout moment de l'expérience.

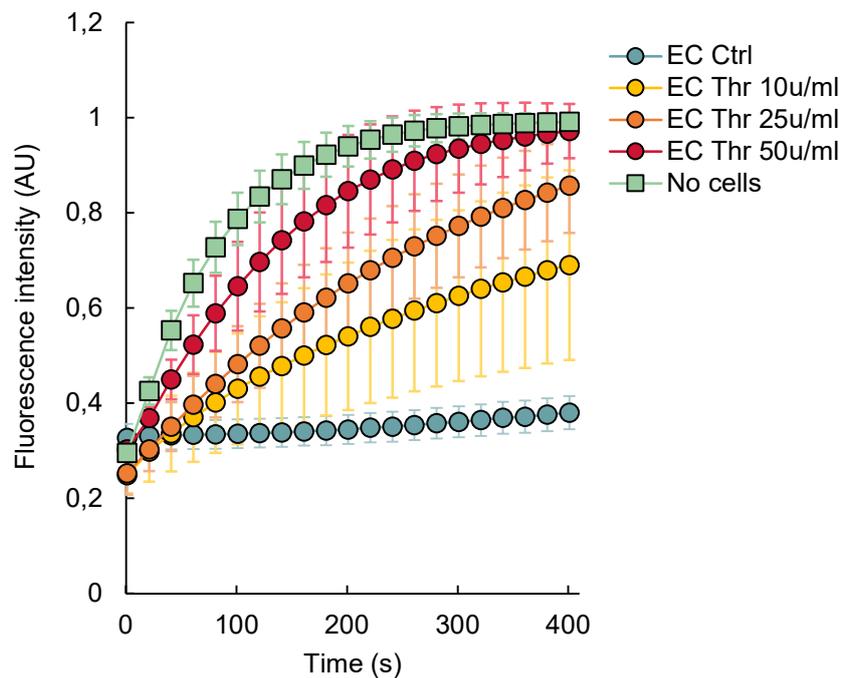


Figure 3-51 Diffusion de dextran 70kDa-FITC dans la couche de collagène en fonction du temps mesuré à partir d'images de vidéomicroscopie fluorescente à l'intérieur d'un canal de 1 mm de large, . EC ; cellules endothéliales, Thr; thrombine. No cells : canaux de collagène non tapissés d'EC. n=3 microvaisseaux par conditions, 5 régions par vaisseau ont été sélectionnées pour quantifier la diffusion, 1 point toutes les 10s a été extrait des mesures 3 images/s en temps réel.

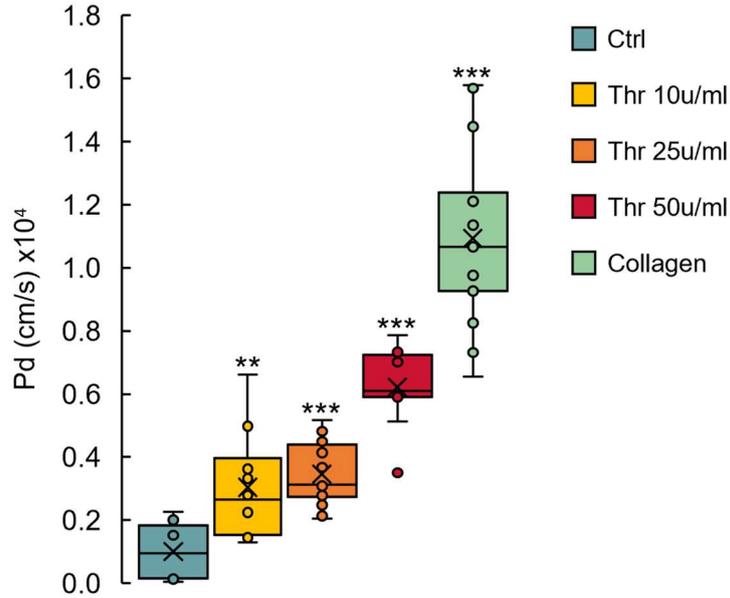


Figure 3-52 Coefficients de perméabilité diffusive calculés. Thr; thrombine. Collagen : canaux de collagène non tapissés de cellules endothéliales. n=3 microvaisseaux par conditions. 5 régions ont été sélectionnées par vaisseau pour quantifier la diffusion, \*\*P<0,01, \*\*\*P<0,001 ns ; non significatif, comparé par rapport à Ctrl.

Les vaisseaux ayant été utilisés au cours des tests de perméabilité ont été ensuite fixés et les jonctions intercellulaires visualisées après marquages par immunofluorescence de la VE-cadhérine et de ZO-1. Les vaisseaux non traités ont montré une répartition de la VE-cadhérine homogène et continue de toutes les cellules endothéliales, illustrant une jonction adhérente intacte qui correspondait aux données de perméabilité faible (Figure 3-53). Le traitement des vaisseaux avec des quantités croissantes de thrombine a affecté de manière correspondante l'aspect des jonctions adhérentes, jusqu'à un point où certaines cellules endothéliales se sont détachées, laissant des espaces ouverts dans la monocouche lorsque celle-ci avait été traitée avec 50 u/ml de thrombine. Ceci est également corrélé aux coefficients de perméabilité diffusive extrêmes observés avec ces vaisseaux.

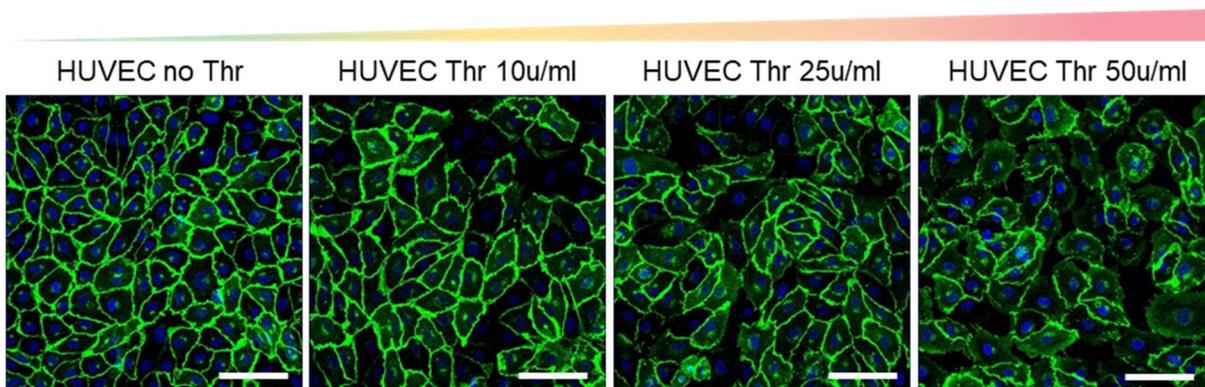


Figure 3-53 3-54 Images en microscopie confocale des vaisseaux sanguins après réalisation des tests de perméabilité. Les vaisseaux ont été marqués pour la VE-cadhérine (vert) et les noyaux colorés au DAPI (bleu). Projection d'intensité maximale de l'axe Z, Thr ; thrombine, barre=100µm

Des observations similaires ont été faites pour les jonctions serrées, les vaisseaux non traités montrant un marquage de ZO-1 continu, fin et homogène autour des cellules endothéliales, alors que les vaisseaux traités avec 50u/ml de thrombine ont montré des ruptures partielles dans les jonctions et une intensité de signal globalement plus faible (Figure 3-55 et Figure 3-56).

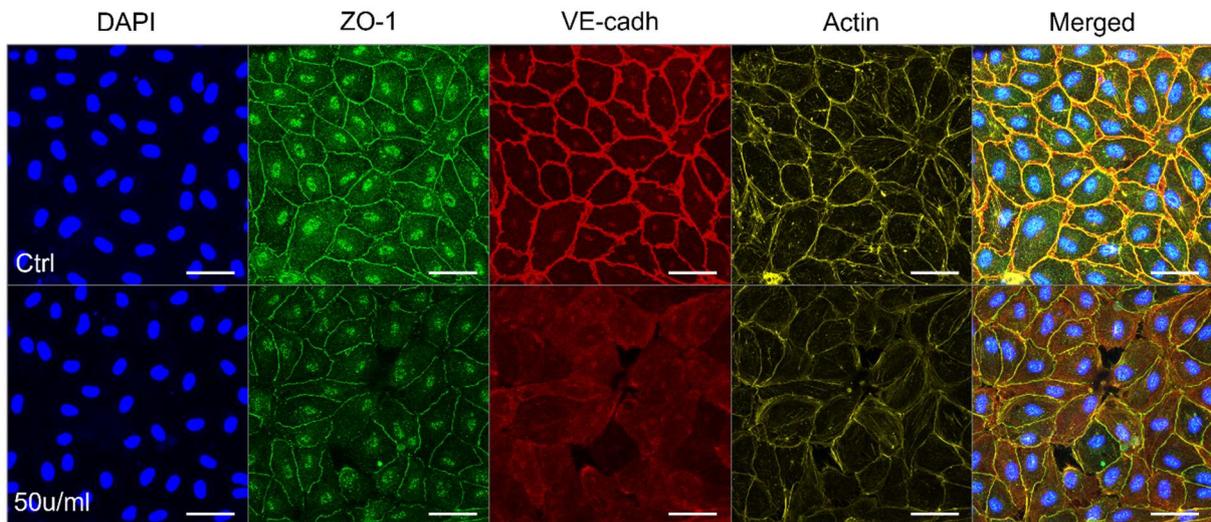


Figure 3-55 Images en microscopie confocale des vaisseaux sanguins après les tests de perméabilité. Les vaisseaux ont été marqués pour les noyaux des cellules (DAPI, bleu) pour la molécule de jonction serrée ZO-1 (vert), pour la molécule de jonction adhérente VE-cadhérine (VE-cadh, rouge), pour les filaments d'actine (Actin, jaune). Projection d'intensité maximale de l'axe Z, Thr ; thrombine, barre=100µm

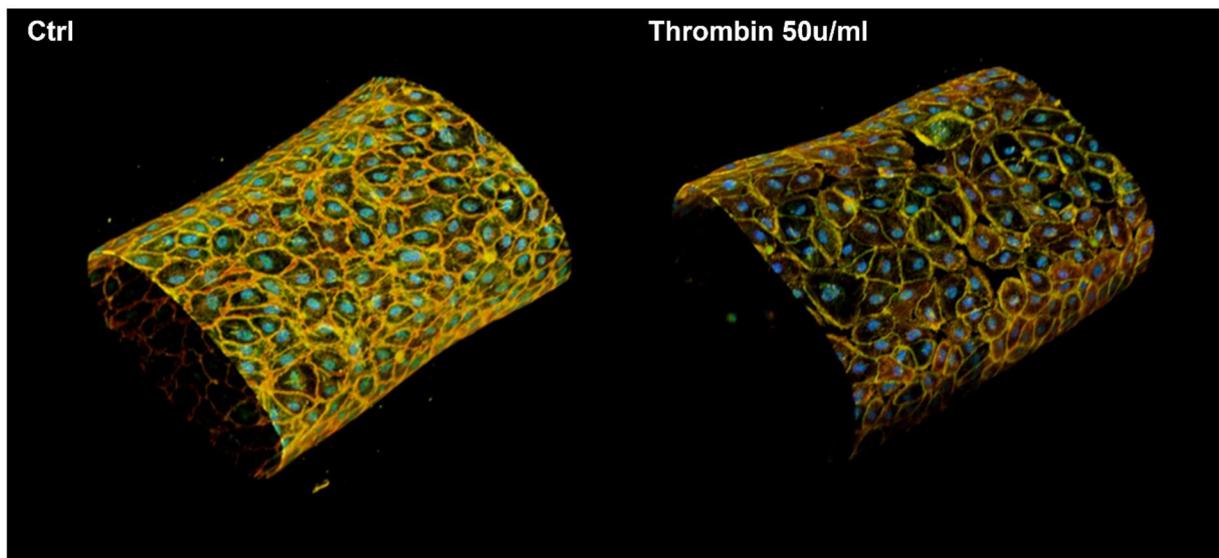


Figure 3-56 Reconstruction 3D des vaisseaux traités ou non à la thrombine par imagerie confocale. Les vaisseaux ont été marqués pour la jonction adhérente (VE-cadhérine, rouge), pour la jonction serrée (ZO-1, vert), pour les filaments d'actine (jaune) et les noyaux ont été colorés au DAPI (bleu).

En conclusion de cette partie, nous avons montré que la présence de l'endothélium des vaisseaux sur puce formait effectivement une barrière à la perméation et que celui-ci répondait à une stimulation vaso-perméante. La conception des puces nous a permis de visualiser et de quantifier ces effets en temps réel et de procéder à une analyse par immunomarquage à postériori.

### 3.2.4 Enrichissement du modèle avec une multicouche cellulaire

Les cellules périvasculaires, telles que les péricytes dans les capillaires et les musculaires lisses dans les vaisseaux de taille plus large, participent à la stabilité et au maintien de l'intégrité de la barrière vasculaire [252]. Les vaisseaux qui avaient été conçus jusqu'alors ne comportaient pas de cellules périvasculaires. Dans le but de reproduire de telles structures cellulaires plus complètes, nous avons tiré avantage de la méthode de double VFP que nous avons mise au point précédemment pour créer des couches concentriques des deux types cellulaires autour de la lumière des vaisseaux (Figure 3-57). Ainsi, un premier VFP a permis de déposer la couche cellulaire externe, entourée de la première épaisseur de collagène et constituée de fibroblastes pulmonaires humains normaux (NHLF) préalablement marqués à la calcéïne AM. En effet, ces cellules ont démontré leur capacité à se comporter comme des cellules périvasculaires dans des approches d'organes sur puce [80]. Un second VFP a permis, d'une part, de déposer une couche de collagène sur les NHLF et, d'autre part, d'ensemencer celle-ci avec des HUVEC non marquées. Par cette approche originale, nous avons pu ainsi reconstituer les deux principales couches cellulaires de vaisseaux sanguins, apposées dans leur position correcte par rapport à un vaisseau naturel (Figure 3-58).

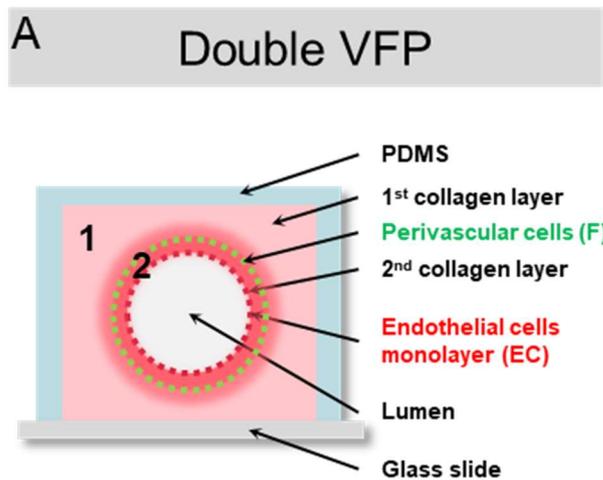


Figure 3-57 Schéma de principe de fabrication du vaisseau sur puce multicouche par double VFP

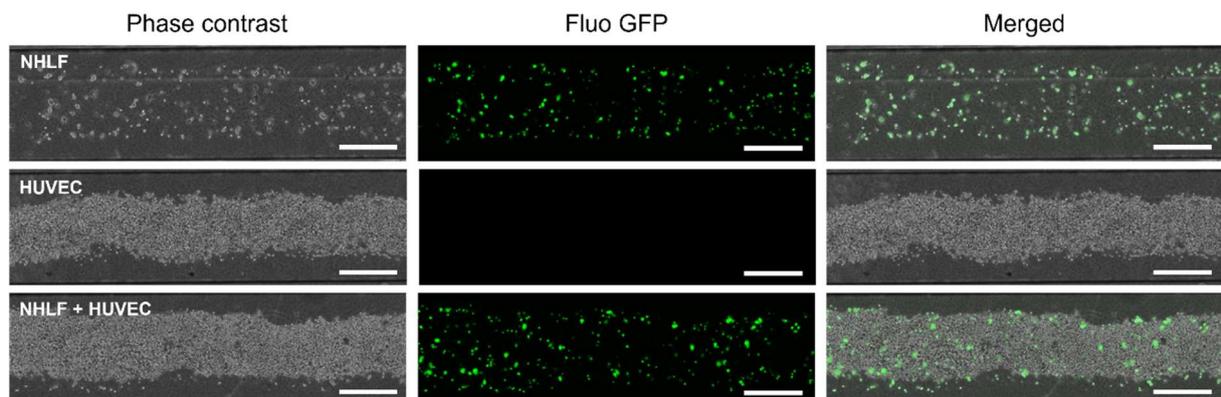


Figure 3-58 Fabrication d'un vaisseau multicouche par double VFP. Le premier VFP est réalisé avec ou sans NHLF et le second avec ou sans HUVEC. Les NHLF ont été marqués à la calcéïne AM (vert) préalablement à leur ensemencement. Barre = 400µm

La morphologie générale de la monocouche de cellules endothéliales ainsi obtenue est restée inchangée et l'immunomarquage pour la VE-cadhérine a montré un schéma classique des jonctions adhérentes de ces cellules. De façon intéressante, les NHLF établis autour de l'endothélium ont adopté une forme étoilée et présenté plusieurs projections en forme de filopodes s'étendant à travers la fine couche de collagène pour établir des contacts directs avec la couche endothéliale, comme dans des vaisseaux sanguins naturels (Figure 3-59).

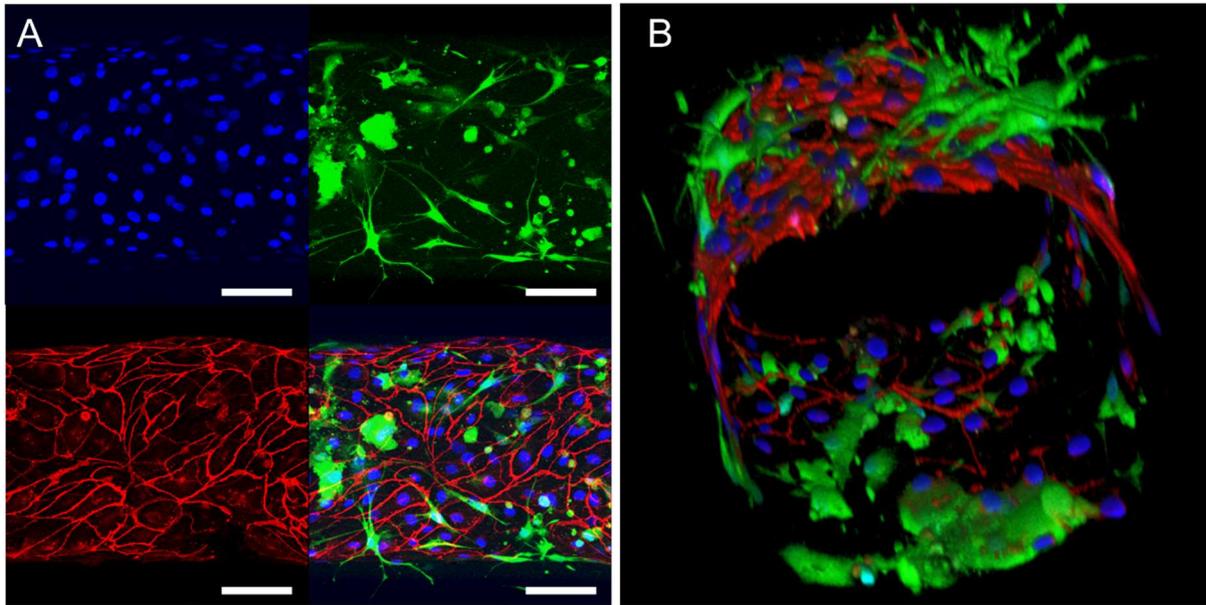


Figure 3-59 Imagerie confocale d'un vaisseau multicouche réalisé par double VFP dans une puce de 400µm. Marquage de la VE-cadhérine (rouge), des noyaux au DAPI (bleu) et des fibroblastes avec la calcéïne AM (vert). Projection sur l'axe Z (A) et reconstruction 3D (B). Barre = 100µm

Une fois des vaisseaux composés ou non d'une multicouche d'HUVEC et de NHLF construits, leur fonction de barrière a été étudiée en utilisant le test de perméabilité au dextran fluorescent, ceci afin d'évaluer si la présence de fibroblastes modifiait cette fonction. Lorsque le lumen n'était pas du tout cellularisé, un coefficient de perméabilité maximal a été mesuré (Figure 3-60). L'ajout de NHLF seuls n'a pas réduit la diffusion du dextran-Texas Red et le « vaisseau » est resté aussi perméable que les lumen constitués uniquement de collagène (Figure 3-61 et Figure 3-62). Ceci suggérait donc que les NHLF ne créaient pas en soi une barrière physique à la diffusion du dextran-FITC à l'extérieur du « vaisseau ». Les vaisseaux sur puce constitués uniquement de cellules endothéliales ont créé une barrière, permettant une diffusion lente mais toutefois mesurable du dextran-Texas Red dans le gel de collagène au fil de l'expérience. Comme précédemment, l'ajout de thrombine a fortement perturbé cette barrière et a permis au dextran de diffuser à des vitesses significativement plus élevées (Figure 3-62). De façon très intéressante, l'ajout de NHLF (1%, ratio d'ensemencement) autour de la monocouche endothéliale a entraîné un resserrement marqué de la barrière puisque la diffusion spontanée du dextran n'était même plus visible sur le temps de l'expérience (Figure 3-60). De plus, ces vaisseaux multicouches se sont montrés beaucoup moins sensibles à la thrombine ; un traitement à 25u/ml ou à 50u/ml entraînant une diffusion significativement plus lente du dextran par rapport aux effets observés en utilisant des doses similaires de thrombine dans les vaisseaux sanguins uniquement composés de cellules endothéliales (Figure 3-61 et Figure 3-62).

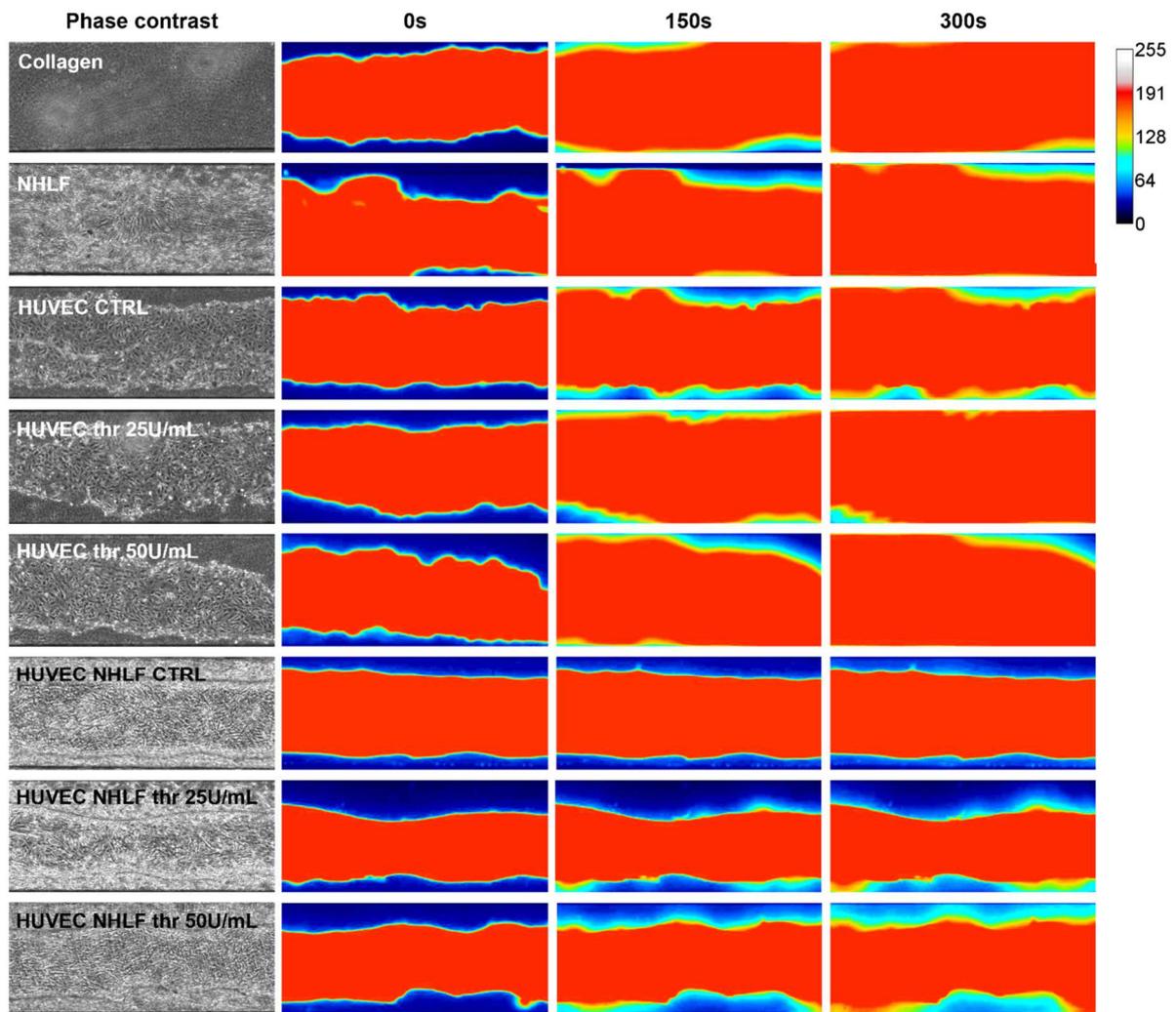


Figure 3-60 Diffusion de dextran 70kDa-Texas Red dans la couche de collagène en fonction du temps et de la dose reçue de thrombine (thr). n=3 microvaisseaux par condition. Les microcanaux utilisés avaient une largeur de 1000  $\mu\text{m}$ . Les images ont été extraites d'enregistrements vidéo à t=0, 150s ou 300s après injection de dextran 70kDa-Texas Red. Collagen; lumens non cellularisés, NHLF; vaisseaux cellularisés avec des fibroblastes, HUVEC; vaisseaux cellularisés avec des endothéliales, HUVEC NHLF; vaisseaux constitués d'une couche de fibroblastes entourant une couche de cellules endothéliales, CTRL; absence de traitement, thr; vaisseaux traités par la thrombine aux concentrations indiquées.

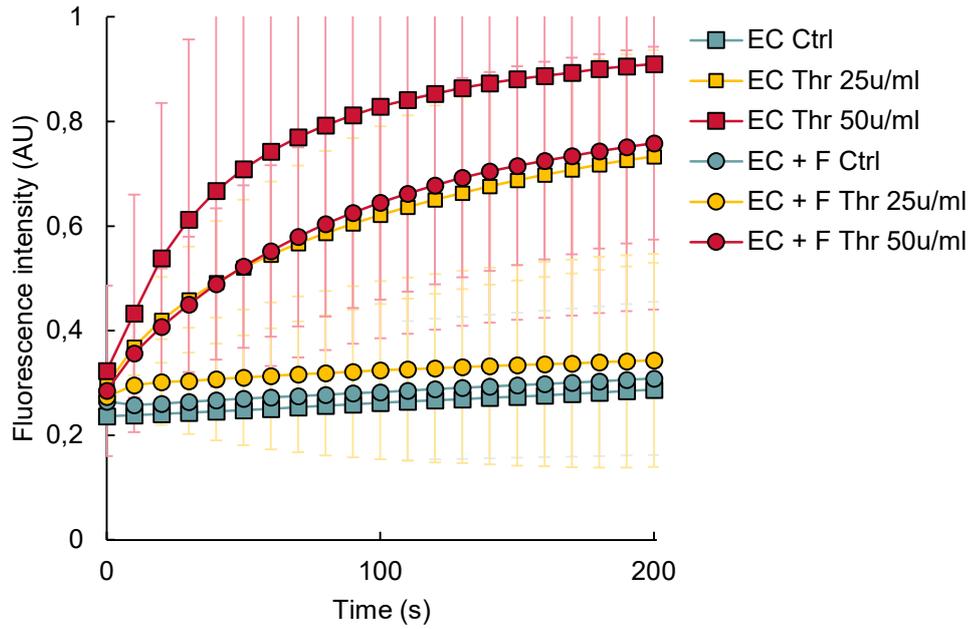


Figure 3-61 Diffusion de dextran 70kDa-Texas red dans la couche de collagène en fonction du temps, à l'intérieur d'un canal de 1mm de large, mesuré à partir d'images de vidéomicroscopie fluorescente, CE ; cellules endothéliales, F ; Fibroblastes, Thr; thrombine. n=3 microvaisseaux par conditions, 1 point toutes les 10s a été extrait des mesures 3 images/s en temps réel.

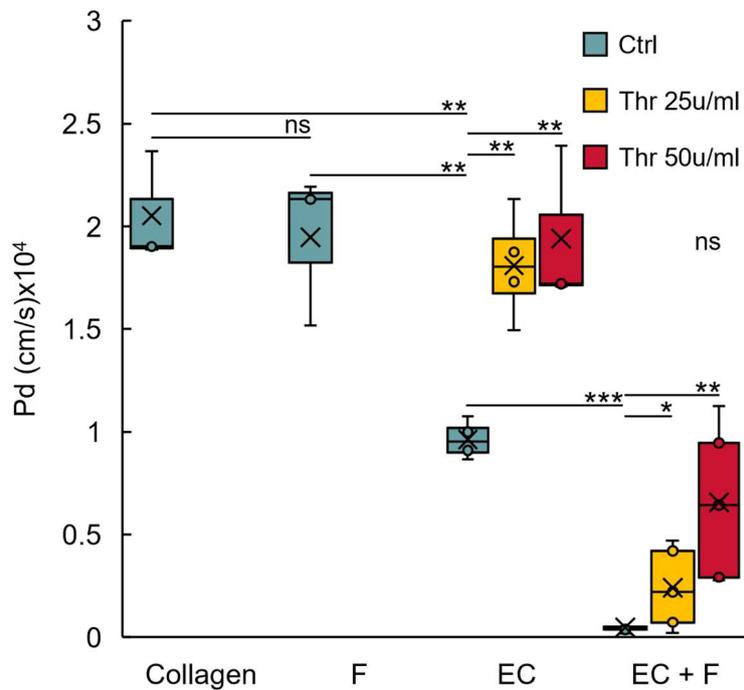


Figure 3-62 Coefficients de perméabilité diffusive calculés. Collagen; vaisseaux non cellularisés, EC ; cellules endothéliales, F ; Fibroblastes, Thr; thrombine. n=3 microvaisseaux par conditions. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  ns ; non significatif, comparé par rapport au contrôle.

Les vaisseaux ayant été traités au cours de ces tests de perméabilité ont été fixés et les jonctions intercellulaires ont été visualisées après marquages par immunofluorescence de la VE-cadhérine. Comme précédemment, l'ajout de thrombine aux vaisseaux composés uniquement de cellules endothéliales a profondément perturbé les jonctions adhérentes avec une disparition progressive de la VE-cadhérine des jonctions. Le marquage  $\alpha$ -SMA a révélé la présence des fibroblastes autour de la monocouche endothéliale et montré que les deux couches cellulaires restaient bien distinctes. En présence des NHLF et en l'absence de stimulation par la thrombine, il apparaît que la VE-cadhérine se soit accumulée de façon plus marquée aux jonctions, nous n'avons toutefois pas approfondi ce point par une étude plus poussée.

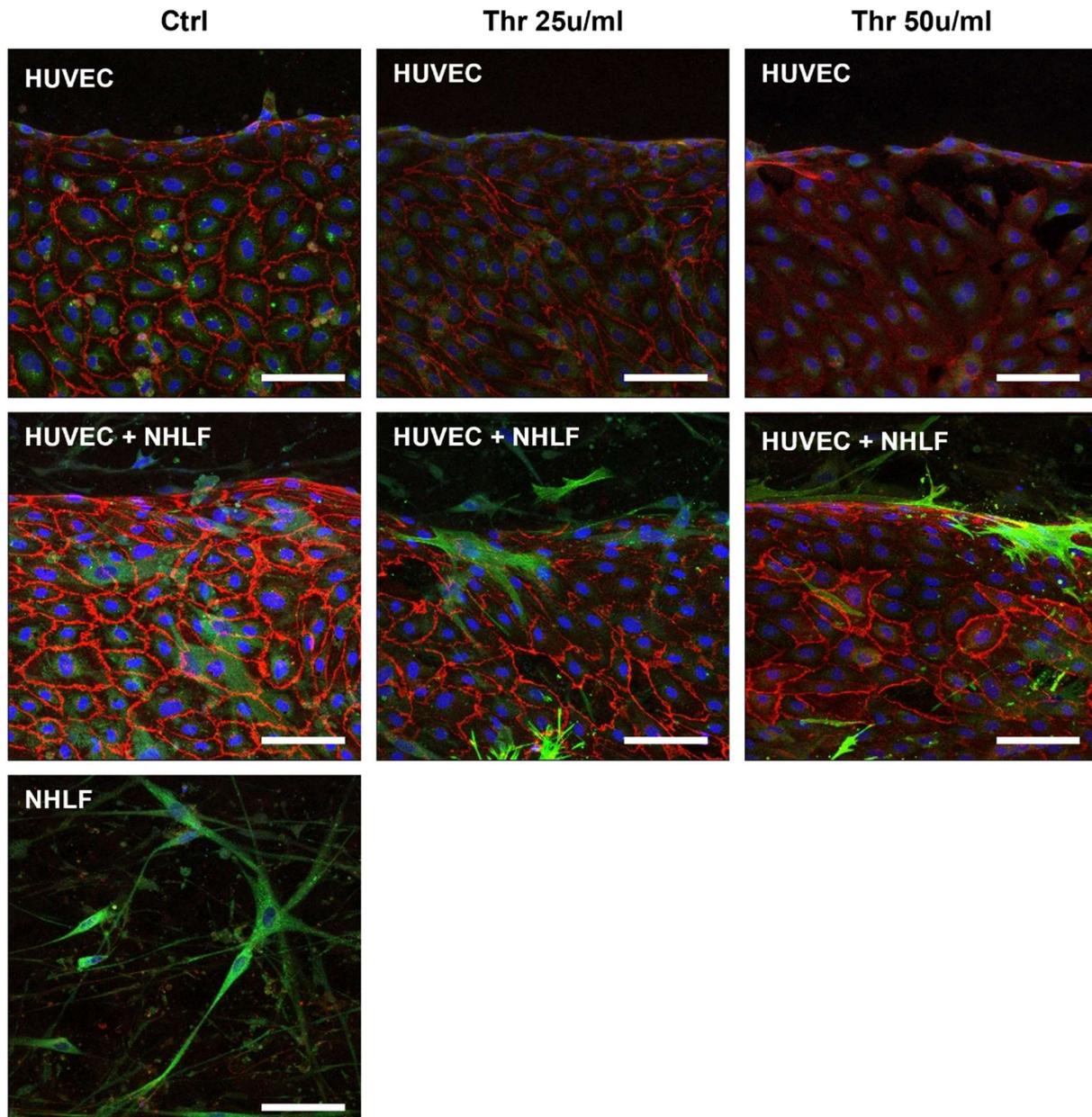


Figure 3-63 Images en microscopie confocale des vaisseaux sanguins utilisés lors des tests de perméabilité. Les vaisseaux ont été marqués pour la VE-cadhérine (rouge),  $\alpha$ -SMA (vert) et les noyaux ont été colorés au DAPI (bleu). Projection d'intensité maximale de l'axe Z, Thr ; thrombine, barre=100μm

Etant donné que les NHLF ont montré une influence positive sur la fonction de barrière de l'endothélium et que, d'autre part, les vaisseaux sanguins naturels présentent des ratios péricytes/endothéliales variables selon la localisation tissulaire [253], [254], nous avons modulé ce ratio de 0 à 6% (ratio d'ensemencement) dans nos vaisseaux sur puce. La fonction de barrière a été ensuite évaluée par le calcul des coefficients de diffusion qui ont montré que plus le ratio NHLF/HUVEC était élevé, moins ces vaisseaux étaient sensibles à l'action vaso-perméante de la thrombine (Figure 3-64 et Figure 3-65).

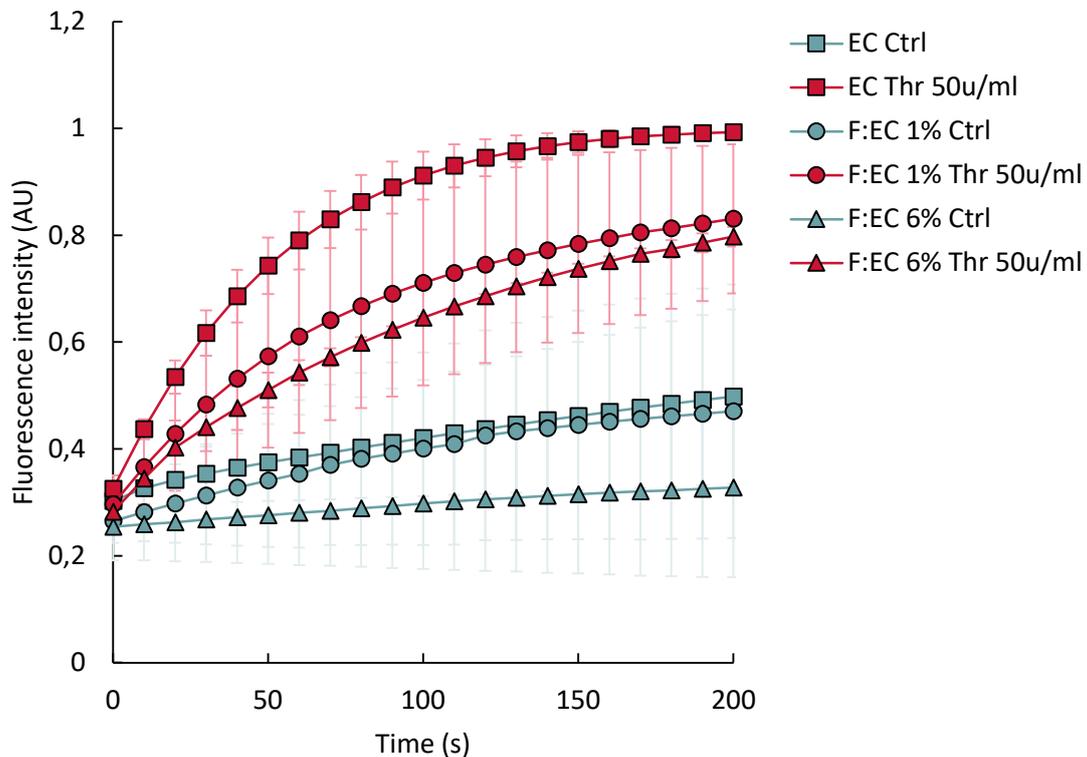


Figure 3-64 Diffusion de dextran 70kDa-Texas red dans la couche de collagène en fonction du temps à l'intérieur d'un canal de 1 mm de large, mesuré à partir d'images de vidéomicroscopie à fluorescence, EC ; cellules endothéliales, F ; Fibroblastes, Thr; thrombine. F :EC indique le ratio de fibroblastes par rapport aux endothéliales. n=3 microvaisseaux par conditions, 1 point toutes les 10s a été extrait des mesures 3 images/s en temps réel.

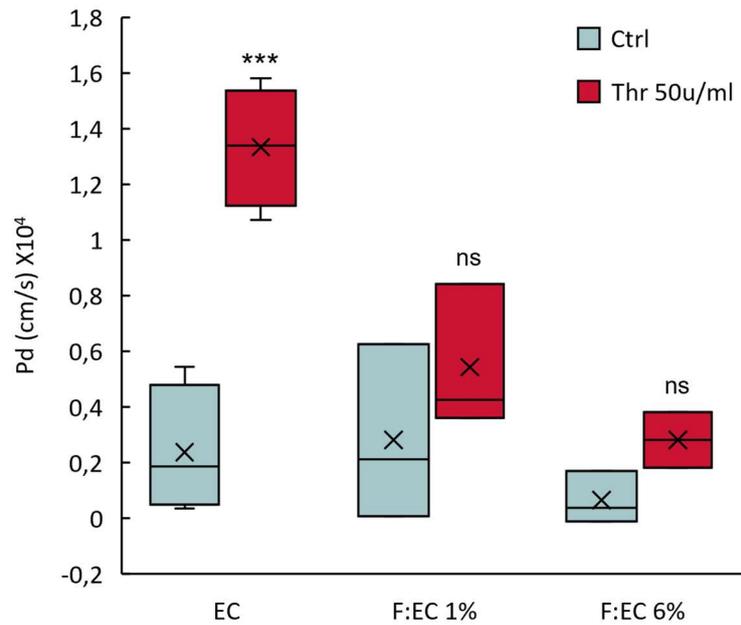


Figure 3-65 Coefficients de perméabilité diffusives calculés. EC ; cellules endothéliales, F ; Fibroblastes, Ctrl; vaisseaux non traités, Thr; thrombine, F :EC indique le ratio de fibroblastes par rapport aux endothéliales. n=3 microvaisseaux par conditions. \*\*\*P<0,001 ns ; non significatif, comparé par rapport à Ctrl.

Comme précédemment, ces vaisseaux ont ensuite été immunomarqués afin de visualiser les jonctions adhérentes *via* la VE-cadhérine et les fibroblastes par  $\alpha$ -SMA, ce qui a notamment permis d'apprécier que les différences de ratio F:EC à l'ensemencement semblaient conservées après 8 jours de culture (Figure 3-66).

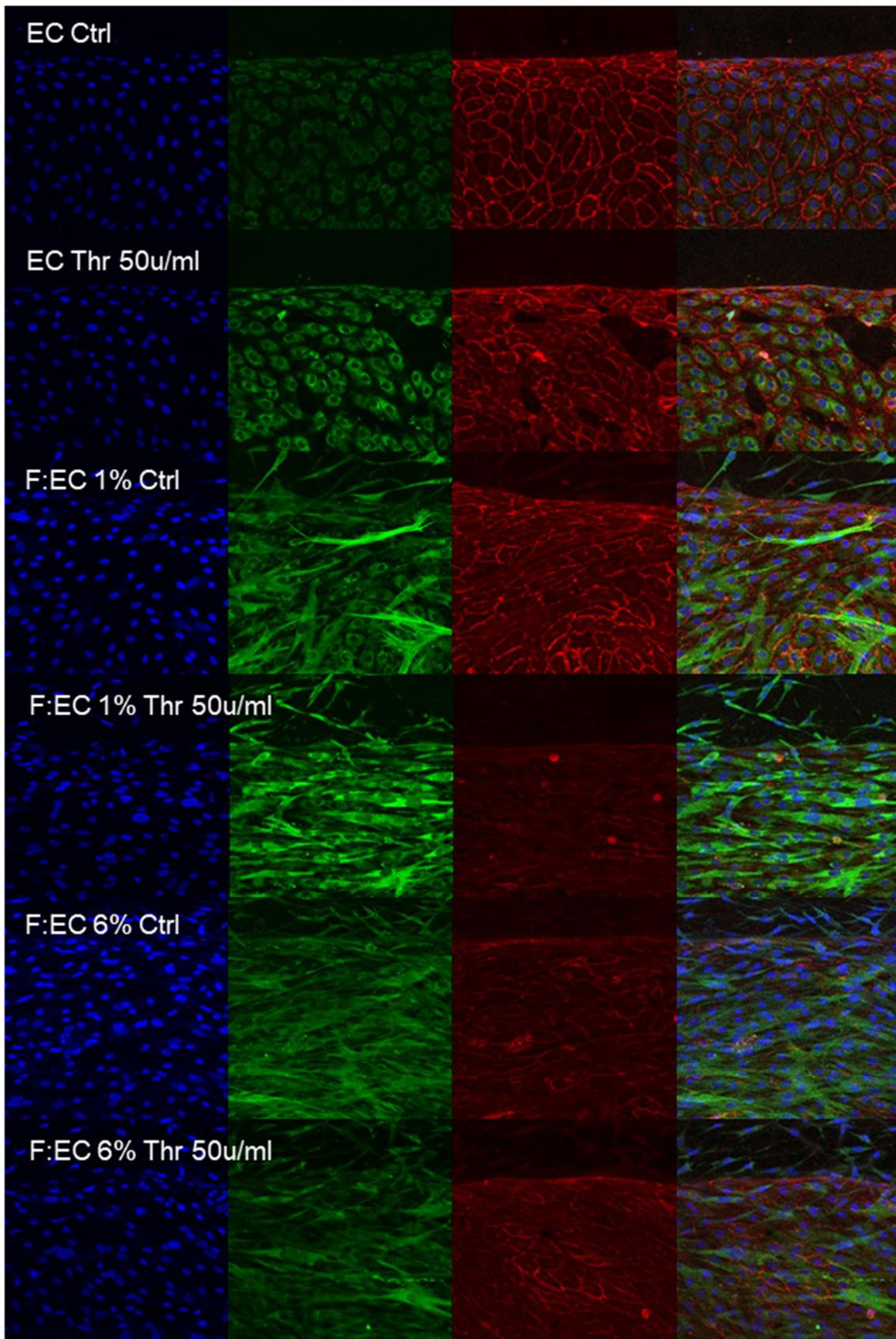


Figure 3-66 Imagerie confocale de la rupture de la barrière vasculaire après les tests de perméabilité dans des vaisseaux multicouches composés de différents ratios fibroblastes:endothéliales (F:EC). Les vaisseaux ont été marqués pour les jonctions adhérentes (VE-cadhérine, rouge),  $\alpha$ -SMA (vert) et noyaux (DAPI, bleu). Projection d'intensité maximale de l'axe Z. EC ; cellules endothéliales, F ; Fibroblastes, Thr ; thrombine.

En conclusion de cette partie, l'approche double VFP constitue un moyen original de reproduire la structure tridimensionnelle d'un vaisseau naturel avec une apposition concentrique des couches endothéliales et périvasculaires autour du lumen. Cette structuration et la présence de cellules périvasculaires induisent un renforcement très important de la fonction de barrière de ces vaisseaux sur puce.

### 3.2.5 Diversification du modèle cellulaire

Les HUVEC constituent une source robuste et fiable de cellules endothéliales vasculaires pour la mise au point d'approches de vaisseaux sur puce mais l'origine de ces cellules (veine ombilicale) n'est pas représentative d'endothélie d'autres organes. D'autres part, les modèles que nous mettons en place sont conçus de manière à être adaptables à la source cellulaire et leurs conditions de culture. Dans le but de mettre en place des vaisseaux sanguins sur puce pertinents pour l'étude d'autres configurations tissulaires, nous avons diversifié nos modèles en utilisant notamment des cellules endothéliales de poumon (HMVEC-L) et sinusoidales de foie (SK-HEP-1).

#### 3.2.5.1 Etablissement d'un vaisseau sanguins pulmonaire sur puce

Afin d'établir un vaisseau sur puce à partir de cellules endothéliales primaires de poumon humain, nous avons réalisé le processus de VFP en utilisant des cellules HMVEC-L en remplacement des HUVEC. Les observations ont montré que ces cellules étaient tout à fait capables de s'établir en une monocouche confluyente sur le collagène I et de former une barrière au passage du dextran 70kDa-Texas Red ( $0,66 \cdot 10^{-4}$  cm/s) (Figure 3-67). Cependant, celle-ci était, sans traitement, moins efficace que celle formée par les HUVEC ( $0,10 \cdot 10^{-4}$  cm/s). Le traitement de ces vaisseaux par la thrombine induit une perméabilité vasculaire dans des valeurs de coefficients de diffusion comparables à celles mesurées avec les HUVEC dans les mêmes conditions (Figure 3-68 et Figure 3-69).

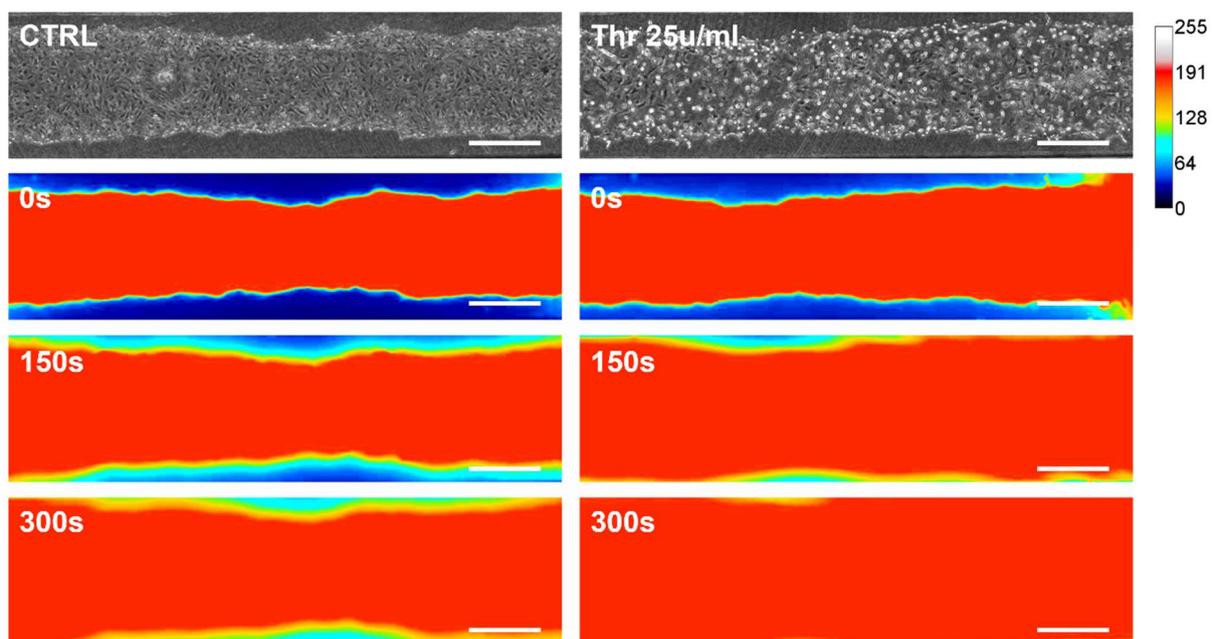


Figure 3-67 Test de perméabilité de vaisseaux pulmonaires sur puce. Diffusion de dextran-70 kDa Texas Red dans la couche de collagène en fonction du temps et de la dose reçue de thrombine (Thr). n=4 microvaisseaux par condition. Les microcanaux utilisés avaient une largeur de 1000  $\mu$ m. Les images ont été

extraites d'enregistrements vidéo à 0, 150s ou 300s après injection de dextran-70 kDa Texas Red. CTRL; vaisseau non traité.

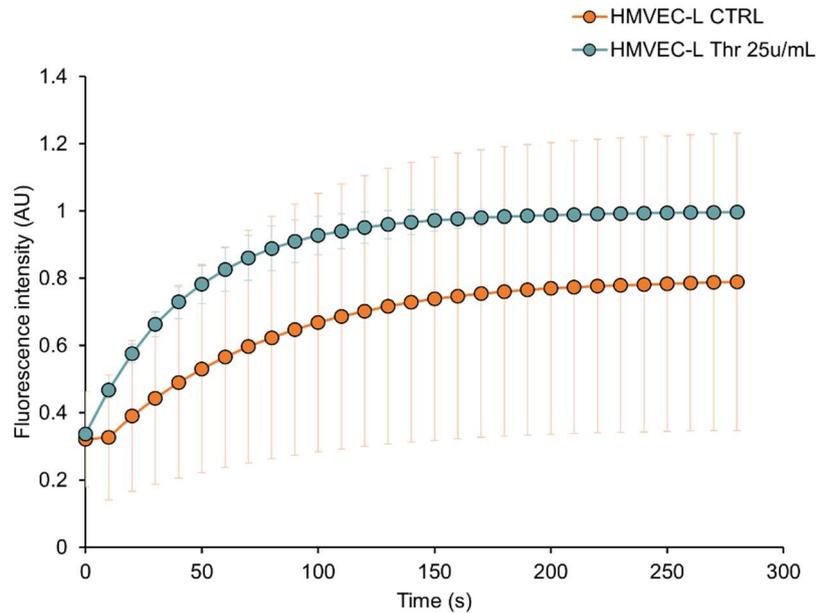


Figure 3-68 Diffusion de dextran-70 kDa Texas Red dans la couche de collagène en fonction du temps et de la dose reçue de thrombine (Thr) d'un vaisseau pulmonaire sur puce à l'intérieur d'un canal de 1 mm de large, mesuré à partir d'images de vidéomicroscopie fluorescente, n=4 microvaisseaux par conditions, 1 point toutes les 10s a été extrait des mesures 3 images/s en temps réel. CTRL; vaisseau non traité

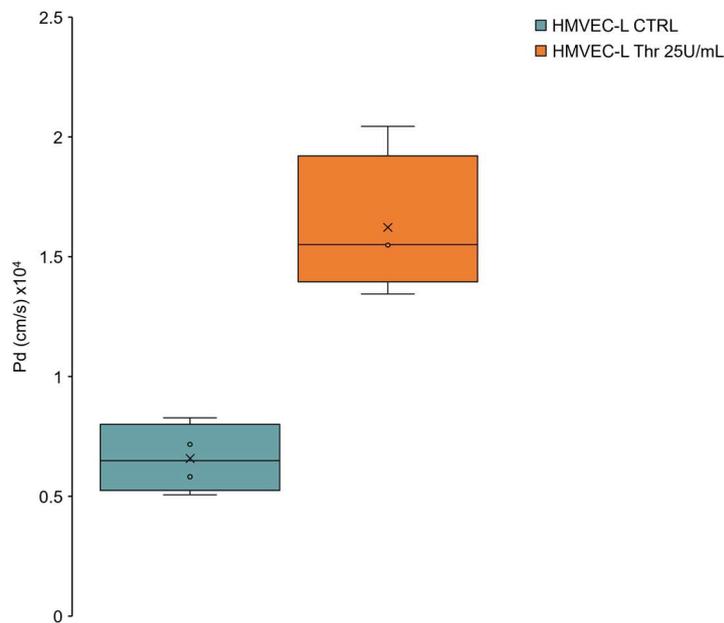


Figure 3-69 Coefficients de perméabilité diffusive calculés sur des vaisseaux pulmonaires sur puce traités (Thr) ou non (CTRL) à la thrombine. n=4 microvaisseaux par conditions.

### 3.2.5.2 Etablissement de cellules endothéliales sinusoidales de foie en vaisseau sur puce

Toujours dans cette idée de diversification des sources de cellules endothéliales, nous avons utilisé une lignée de cellules endothéliales sinusoidales de foie pour créer des vaisseaux sur puce hépatiques. Si l'ensemencement et la culture des cellules n'a pas posé de problème à priori dans ces conditions, ces cellules n'ont cependant pas formé une monocouche continue et jointive dans nos dispositifs (Figure 3-70). Des données préliminaires de l'équipe ont montré que ces cellules adoptaient une morphologie à confluence plus proche d'un endothélium jointif quand elles étaient cultivées en EMEM additionné d'EGM-2. Nous avons donc comparé les effets du milieu de culture recommandé EMEM à un milieu d'EGM/MEM. D'un point de vue morphologique, les SK-HEP-1 cultivées en EMEM ne se sont pas établies en monocouche, alors que l'addition d'EGM-2 a amélioré faiblement l'aspect de la monocouche (Figure 3-70).

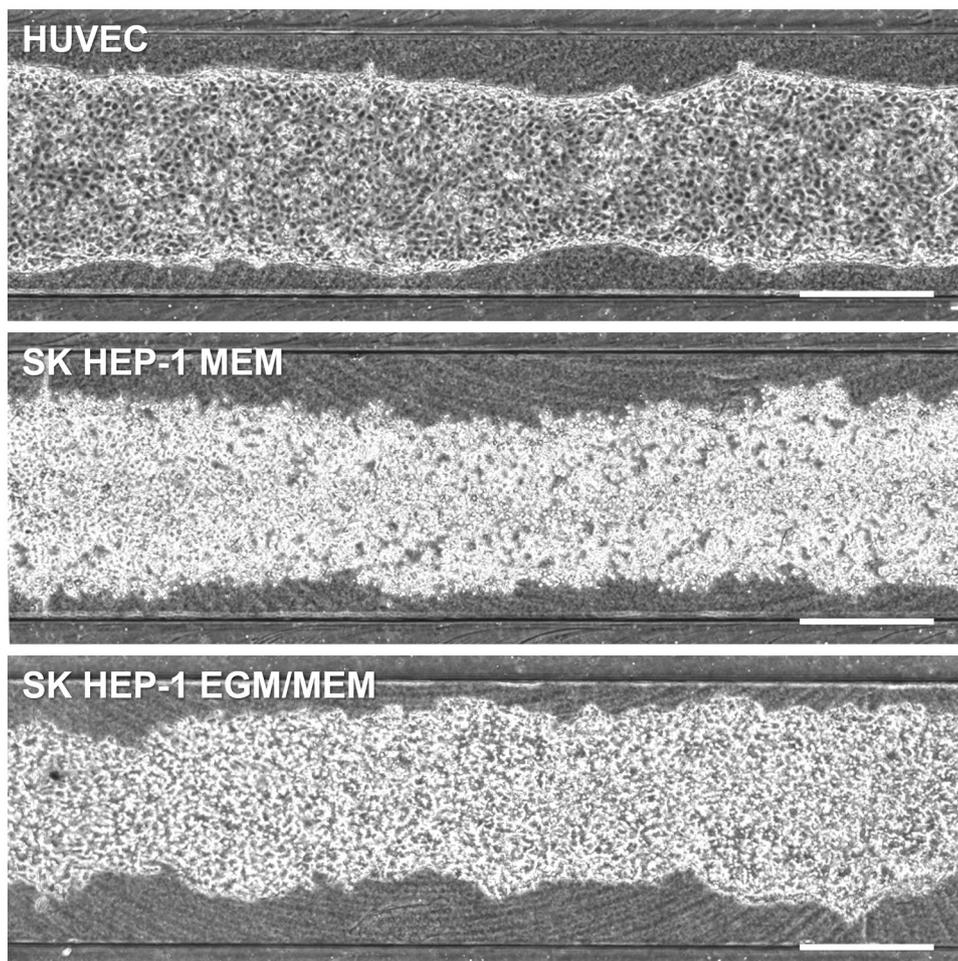


Figure 3-70 Images en contraste de phase de vaisseaux sur puce réalisés avec des HUVEC ou des cellules endothéliales de foie SK-HEP-1 cultivées dans du milieu EMEM (MEM) ou EGM-2/EMEM (EGM/MEM) dans une puce de 1mm. Barre = 500 $\mu$ m

Un immunomarquage et une observation en imagerie confocale des jonctions cellulaires a montré que la VE-cadhérine n'était quasiment pas présente entre ces cellules SK-HEP-1, quelles que soient les conditions de culture (Figure 3-71) et de façon similaire à ce que l'équipe avait constaté avec ces cellules en culture 2D (non montré).

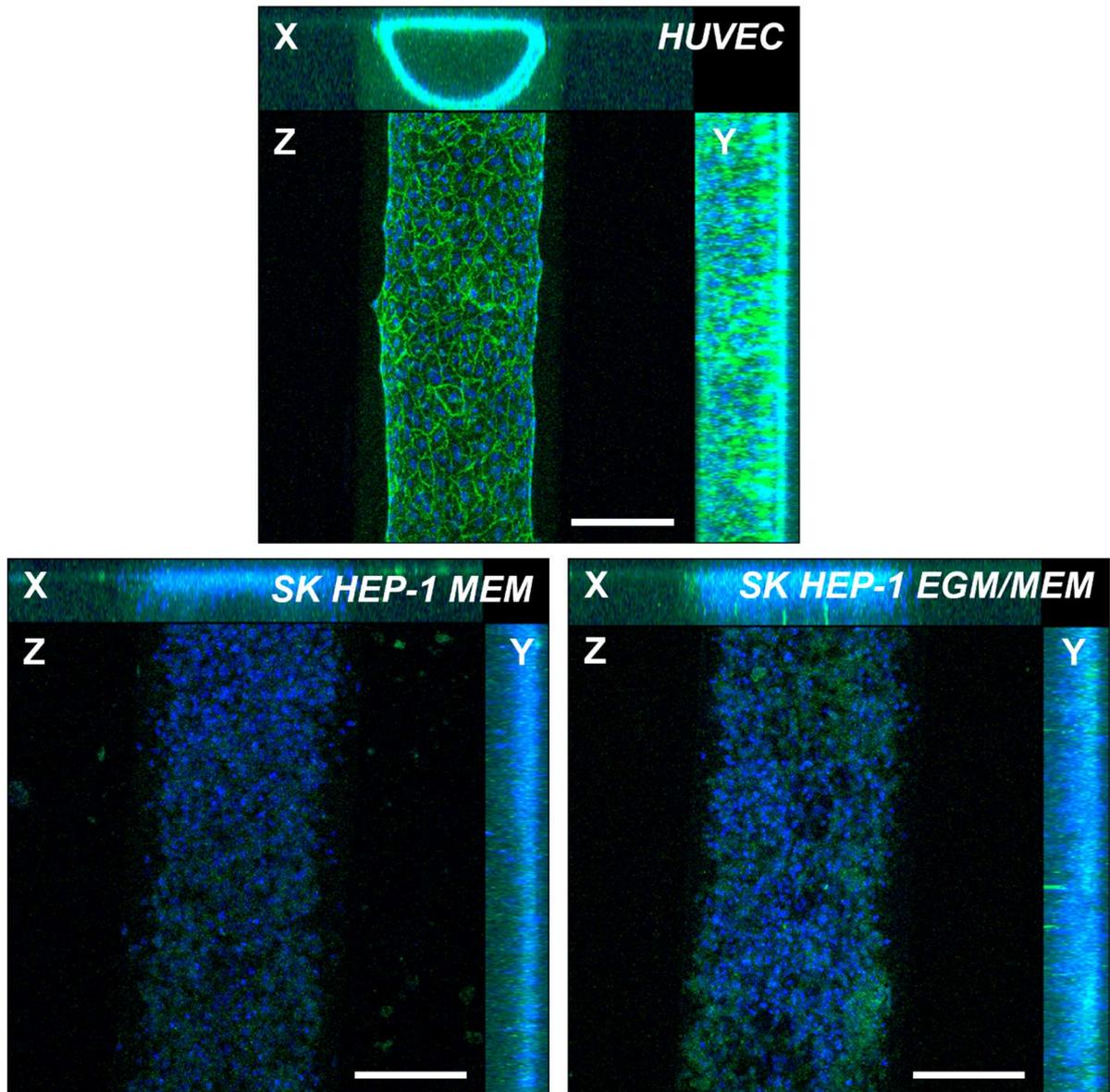


Figure 3-71 Imagerie confocale de vaisseaux fabriqués par VFP avec des HUVEC ou des SK-HEP-1 cultivées dans du milieu EMEM (MEM) ou EGM-2/EMEM (EGM/MEM) et marqués pour la VE-cadhérine (vert) et les noyaux (DAPI, bleu). Projection sur les axes X, Y et Z. Barre = 100µm

Les tests de perméabilité sur ces vaisseaux SK-HEP-1 ont montré que, sans stimulation, ils étaient beaucoup plus perméables de base que des vaisseaux composés d’HUVEC. Leur réponse à la thrombine n’était pas cohérente dans cette expérience unique (Figure 3-72 et Figure 3-73).

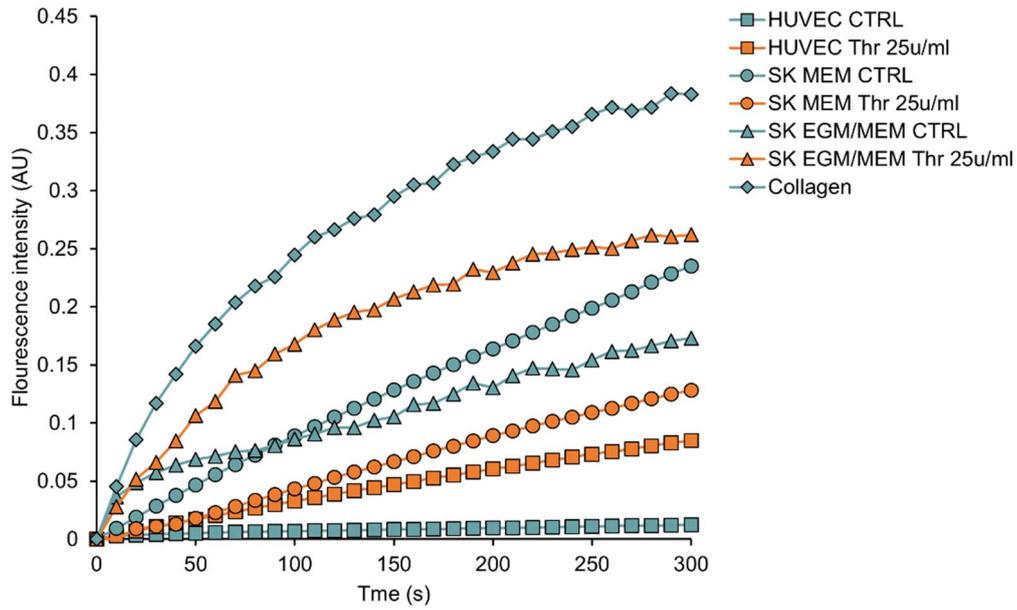


Figure 3-72 Diffusion de dextran-70 kDa Texas Red dans la couche de collagène en fonction du temps, à l'intérieur d'un canal de 1 mm de large, mesuré à partir d'images de vidéomicroscopie fluorescente, n=3 microvaisseaux par conditions, 1 point toutes les 10s a été extrait des mesures 3 images/s en temps réel. Collagène; lumen non cellularisés, SK ; SK-HEP-1 cultivées en EMEM (MEM) ou EGM-2/EMEM (EGM/MEM); CTRL ; vaisseaux non traités, Thr; thrombine

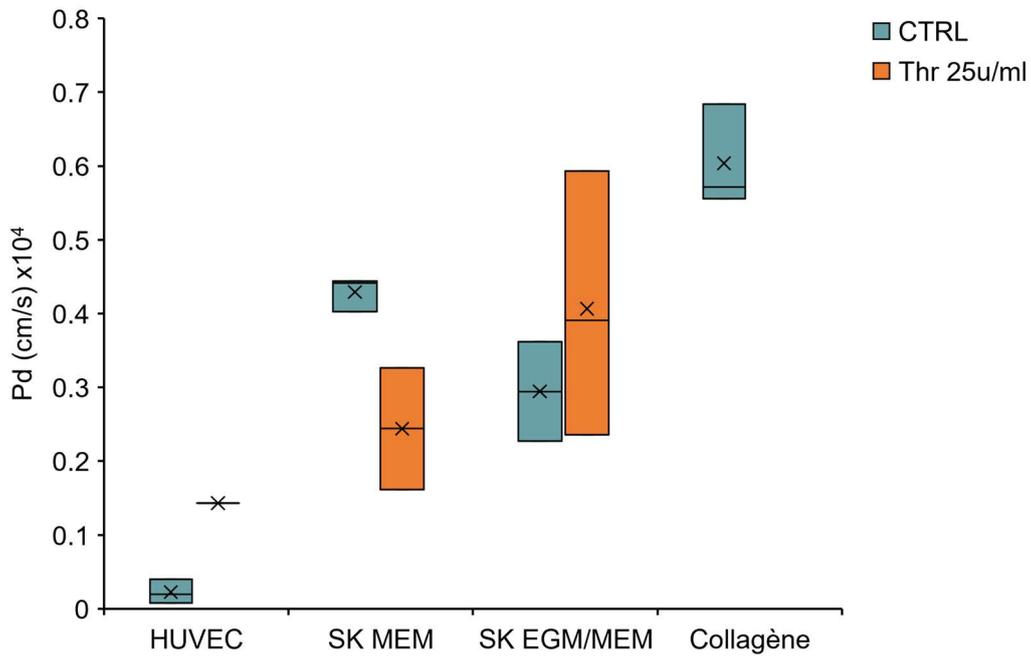


Figure 3-73 Coefficients de perméabilité diffusive calculés. n=3 microvaisseaux par conditions. Collagène; lumen non cellularisés, SK ; SK-HEP-1 cultivées en EMEM (MEM) ou EGM-2/EMEM (EGM/MEM); CTRL ; vaisseaux non traités, Thr; thrombine.

### **3.2.5.3 Bilan des essais de diversification**

En conclusion de cette partie, il apparaît que nos approches sont tout à fait compatibles avec l'utilisation de cellules endothéliales provenant d'autres sources cellulaires. Cependant, il est évident qu'une attention particulière devra être portée à la mise au point des conditions d'établissement et de culture de chaque modèle d'endothélium.

### **3.2.6 Bilan de l'analyse des fonctions biologiques des vaisseaux sur puce**

Finalement, les vaisseaux sur puce que nous avons conçus présentaient une morphologie de monocouche très satisfaisante et une bonne intégrité des jonctions inter-endothéliales. Ces vaisseaux répondaient fonctionnellement à des stimuli pro-inflammatoire ou vasoperméants et nous avons mis en place des méthodes de visualisation en temps réel et de quantification de ces réponses. Grâce à l'approche du double VFP qui a été mise au point, ces premiers vaisseaux ont été raffinés par l'adjonction de cellules qui miment les cellules périvasculaires. La présence de ces cellules complémentaires a significativement renforcé la fonction de barrière de ces vaisseaux sur puce. Enfin, les possibilités de diversifications cellulaires de nos modèles ont été explorées, notamment en utilisant des cellules endothéliales de poumon et de foie et montrent les évolutions possibles de nos vaisseaux vers d'autres contextes tissulaires.

## 3.3 VALORISATION DE NOTRE MODELE

---

A ce stade, nous disposons d'un modèle fonctionnel de vaisseaux sur puce offrant la possibilité d'évaluer l'intégrité de l'endothélium, sa réponse en perméabilité ou en activation en réaction à des molécules actives. Nous avons, d'une part, utilisé ces vaisseaux sur puce dans un autre projet interne à l'équipe. D'autre part, nous avons été sollicités pour utiliser nos modèles dans le cadre de projets s'adressant à la perméabilité vasculaire par d'autres groupes de recherches, notamment, dans le cadre d'études réalisées sur des thérapies anticancéreuses. Cette section décrit les différents travaux qui ont été réalisés dans le cadre de ces collaborations. Tout d'abord l'influence de la transfection des HUVEC avec un anti-miR d'intérêt sur la jonction adhérente a été étudiée. Ensuite, les effets de l'interleukine 6 et de certains de ses variants sur l'activation endothéliale et la perméabilité vasculaire ont été examinés. Puis, nous nous sommes intéressés à la surexpression de SNAIL-1 dans des HUVEC et aux conséquences de celle-ci sur la perméabilité vasculaire. Enfin, nous avons réalisé des travaux préliminaires concernant l'étude des fuites vasculaires liées aux traitements par inhibiteurs de tyrosine kinase.

### 3.3.1 Effet d'un anti-miR d'intérêt sur la perméabilité vasculaire (projet interne)

Les miARNs sont une classe de petits ARN de 21-23bp non codant qui jouent un rôle essentiel dans le contrôle de l'expression de gènes en se fixant sur les ARN messagers et entraînant leur dégradation ou l'inhibition de leur traduction [255]. Les miARNs sont impliqués dans la régulation de processus cellulaires majeurs au cours du développement, de l'initiation et de la progression tumorale. Certains miARNs sont impliqués dans la régulation de l'activation de l'endothélium et l'équipe a identifié un miRNA candidat qui joue un rôle intéressant dans ce processus [256]–[258].

Pour évaluer l'effet d'un anti-miR candidat sur la jonction adhérente et notamment la perméabilité vasculaire, des HUVEC ont été transfectées avec l'anti-miR d'intérêt (anti-miR 3) ou son mimic correspondant (mimic 3). Le test de perméabilité basé sur la diffusion du dextran a été réalisé de la même manière que décrite précédemment sur des vaisseaux composés uniquement d'HUVEC. Les résultats ont montré que les vaisseaux contrôles (mock, anti-miR ctrl et mimic ctrl) avaient une perméabilité sensiblement équivalente alors que les vaisseaux transfectés avec l'anti-miR 3 étaient très perméables, leur coefficient de perméabilité diffusive étant similaire à celui des vaisseaux stimulés en thrombine (Figure 3-74 et Figure 3-75). Au contraire le mimic 3 a semblé induire une réduction de la perméabilité des vaisseaux dans lesquels il avait été transfecté.

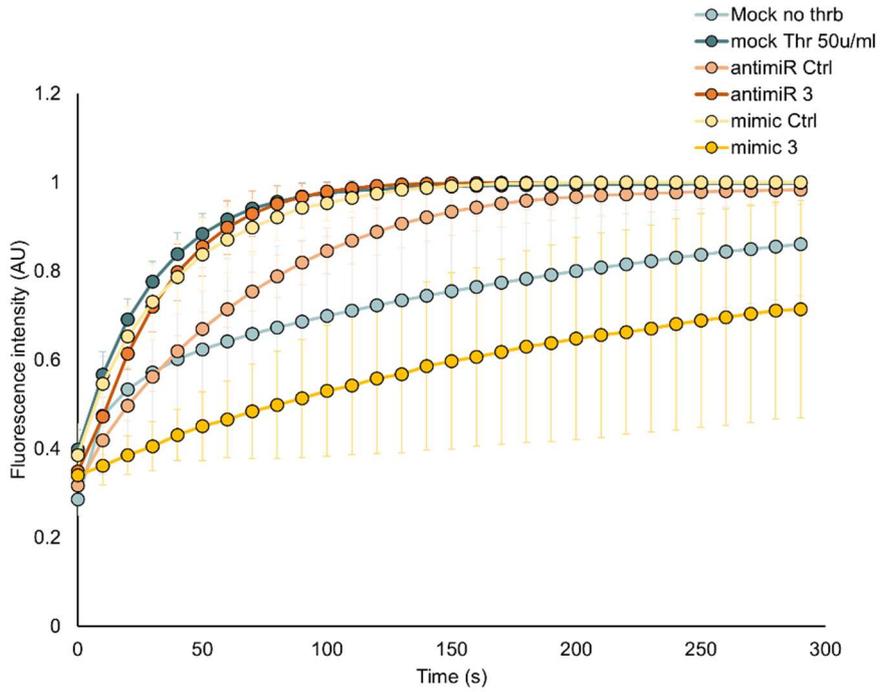


Figure 3-74 Diffusion de dextran-70kDa Texas Red dans la couche de collagène en fonction du temps, à l'intérieur d'un canal de 1 mm de large, mesuré à partir d'images de vidéomicroscopie fluorescente, n=3 microvaisseaux par conditions, 1 point toutes les 10s a été extrait des mesures 3 images/s en temps réel. Mock; HUVEC transfectées sans acide nucléique, Ctrl; ARN non ciblant, Thr; Thrombine

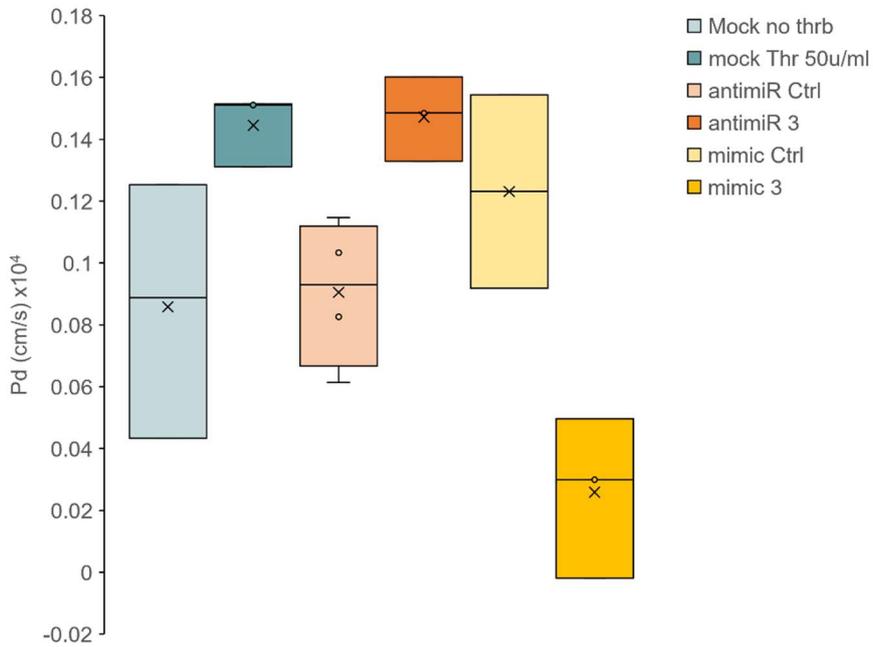


Figure 3-75 Coefficients de perméabilité diffusive calculés. n=3 microvaisseaux par conditions. Mock; HUVEC transfectées sans acide nucléique, Ctrl; ARN non ciblant, Thr; Thrombine

Pour compléter ces observations, les vaisseaux sur puces utilisés pour le test de perméabilité ont été immunomarqués pour la VE-cadhérine, imagés avec un microscope confocal et observés sur leur face inférieure ou en reconstruction 3D. L'anti-miR 3 a provoqué une perturbation flagrante de la jonction adhérente dans la monocouche endothéliale (Figure 3-76 et Figure 3-77). Le mimic 3 a semblé avoir l'effet inverse, il a induit la présence d'une jonction beaucoup plus homogène et continue par rapport au mimic contrôle (Figure 3-78).

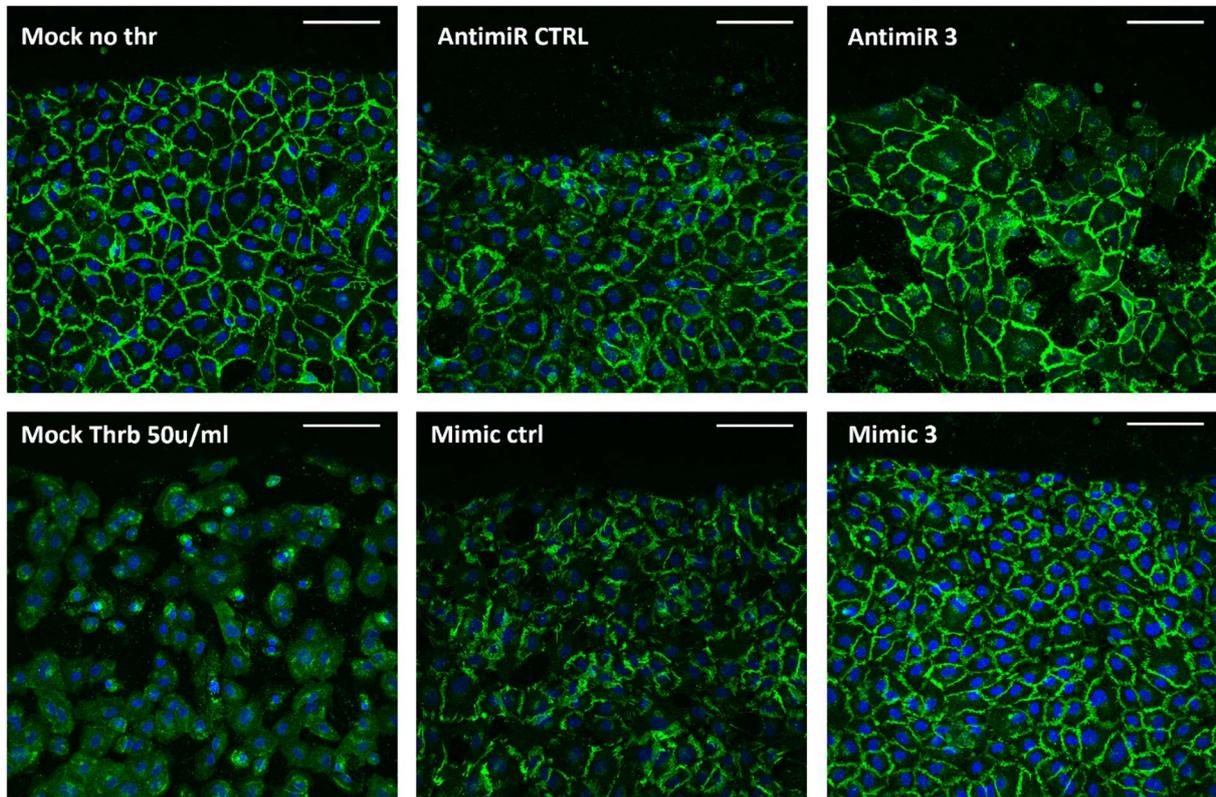


Figure 3-76 Images en microscopie confocale des vaisseaux sanguins après les tests de perméabilité. Les vaisseaux ont été marqués pour la VE-cadhérine (vert) et les noyaux ont été colorés au DAPI (bleu). Projection d'intensité maximale de l'axe Z, barre=100 $\mu$ m. Mock; HUVEC transfectées sans acide nucléique, Ctrl; ARN non ciblant, Thr; Thrombine

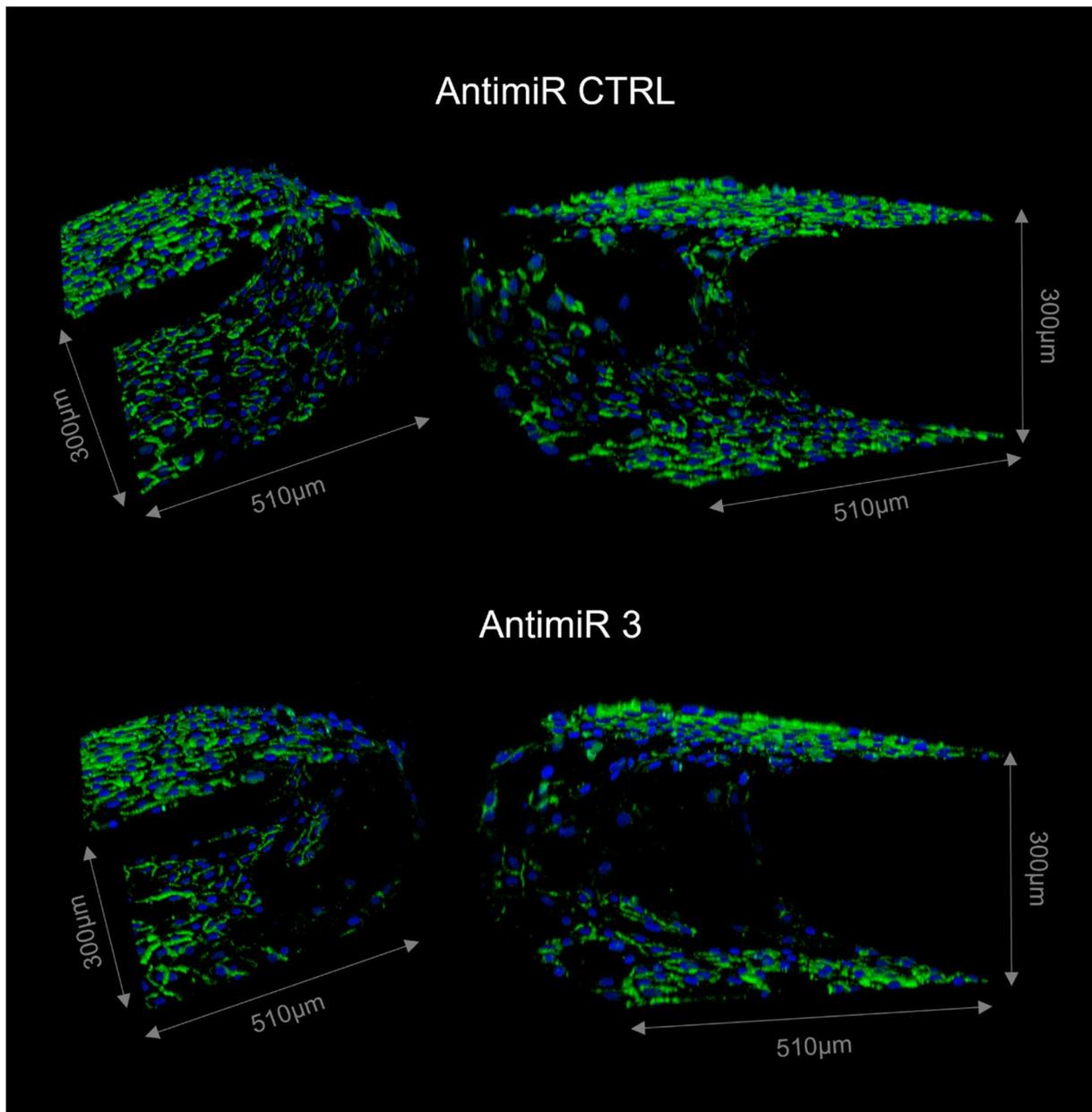


Figure 3-77 Reconstruction 3D en microscopie confocale des vaisseaux sanguins après les tests de perméabilité. Les vaisseaux ont été marqués pour la VE-cadhérine (vert) et les noyaux ont été colorés au DAPI (bleu). CTRL; ARN non ciblant

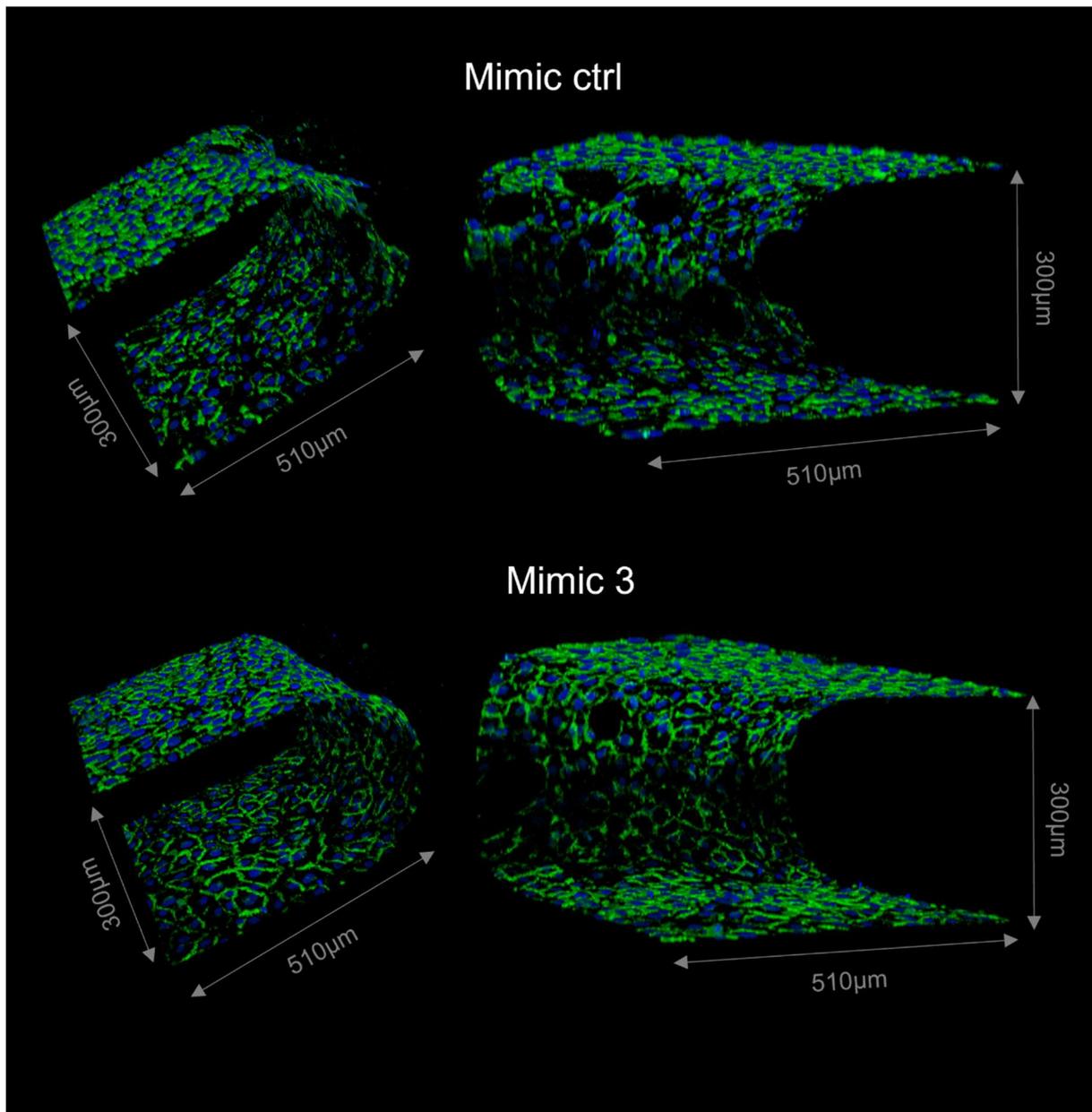


Figure 3-78 Reconstruction 3D en microscopie confocale des vaisseaux sanguins après les tests de perméabilité. Les vaisseaux ont été marqués pour la VE-cadhérine (vert) et les noyaux ont été colorés au DAPI (bleu). Ctrl; ARN non ciblant

L'utilisation des HUVEC transfectées avec l'anti-miR d'intérêt dans nos dispositifs de vaisseaux sur puce a permis de confirmer l'effet perturbateur de celui-ci sur la barrière endothéliale. Ceci a complété des observations faites par l'équipe précédemment dans une configuration 2D concernant l'accumulation de VE-cadhérine après avec le mimic 3. De plus, cela a démontré la possibilité d'utiliser nos modèles avec des cellules endothéliales génétiquement modifiées, ici par transfection transitoire.

### 3.3.2 Effet de la surexpression de SNAIL-1 sur la perméabilité vasculaire (équipe Anna Rita Cantelmo – EGID)

Nous avons été approchés par l'équipe d'Anna Rita Cantelmo pour évaluer l'effet de la surexpression du facteur de transcription SNAIL-1 dans les HUVEC dans le cadre d'une étude du rôle de ce facteur sur la transition endothélium/mésenchyme.

Des vaisseaux sur puce ont été ensemencés avec des HUVEC primaires directement issues de cordons ombilicaux et établis en culture par l'équipe collaboratrice et transfectées stablement avec un vecteur d'expression contrôle ou codant pour SNAIL-1, puis stimulés au TNF $\alpha$  à 10ng/ml pendant 4h. Ensuite, leur perméabilité a été mesurée comme précédemment. Les résultats préliminaires semblent montrer que la surexpression de SNAIL-1 diminue la perméabilité vasculaire dans nos modèles. Ceci semble contradictoire avec la littérature existante [259], [260] mais ces résultats restent à consolider avec, notamment, des cellules issues d'autres donneurs.

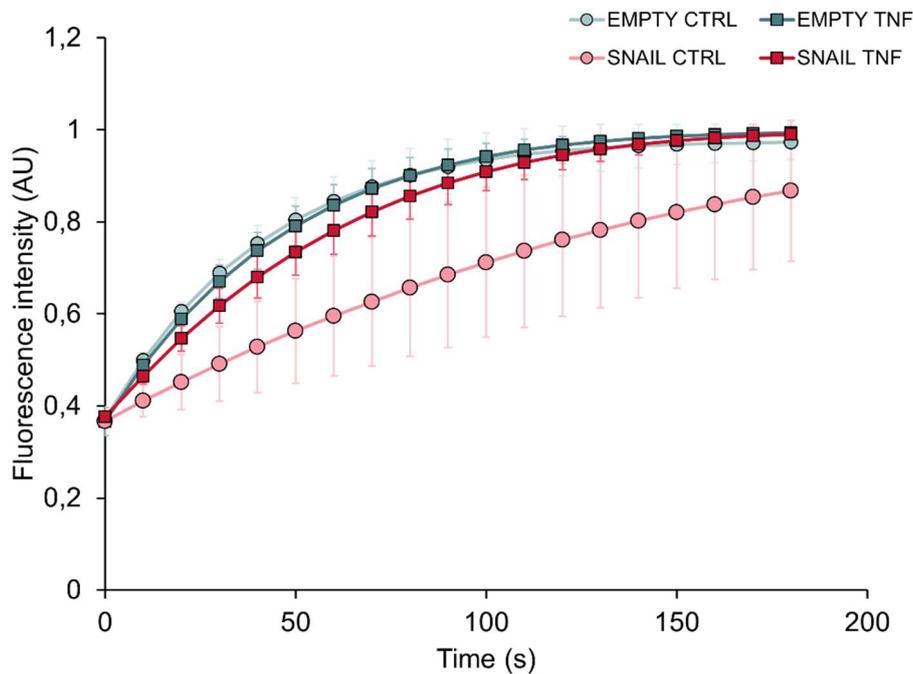


Figure 3-79 Diffusion de dextran-70kDa Texas Red dans la couche de collagène en fonction du temps à l'intérieur d'un canal de 1 mm de large, mesuré à partir d'images de vidéomicroscopie fluorescente, n=6 microvaisseaux par conditions, 1 point toutes les 10s a été extrait des mesures 3 images/s en temps réel. EMPTY; HUVEC transfectées avec un vecteur contrôle, SNAIL; HUVEC transfectées avec un vecteur codant pour SNAIL1, CTRL; vaisseaux non traités, TNF, vaisseaux traités avec 10ng/ml de TNF $\alpha$  pendant 4h.

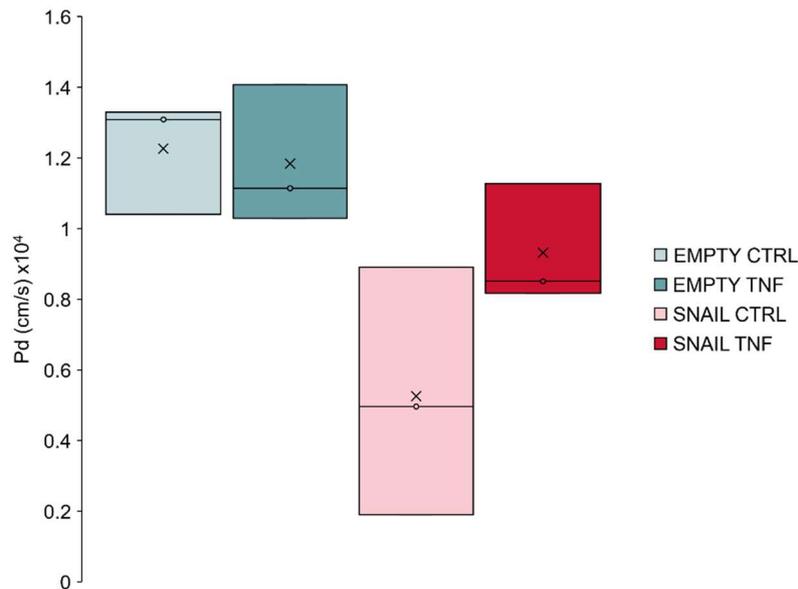


Figure 3-80 Coefficients de perméabilité diffusive calculés. n=6 microvaisseaux par conditions. EMPTY; HUVEC transfectées avec un vecteur contrôle, SNAIL; HUVEC transfectées avec un vecteur codant pour SNAIL1, CTRL; vaisseaux non traités, TNF, vaisseaux traités avec 10ng/ml de TNF $\alpha$  pendant 4h.

### 3.3.3 Effets de variants de l'interleukine 6 sur l'activation endothéliale et la perméabilité vasculaire (équipe Suman Mitra – CANTHER)

#### 3.3.3.1 Effets de variants de l'interleukine-6 sur une monocouche endothéliale

Un des effets secondaires de l'inflammation et donc de la présence d'une quantité élevée de cytokines comme l'IL-6 dans les tissus, est l'apparition d'une hyper perméabilité vasculaire [261]. Celle-ci, même si elle est bénéfique dans un premier temps pour laisser passer les cellules immunitaires par exemple, devient problématique si elle se prolonge dans le temps et entraîne une fuite vasculaire provoquant des œdèmes. Il a été montré qu'une exposition prolongée à l'IL-6 pouvait provoquer une perte des jonctions endothéliales et, donc, induire une hyper perméabilité dans des modèles de culture bidimensionnels [262], [263]. Notre modèle de vaisseaux sur puce apparaissait alors comme un outil pertinent pour étudier la perméabilité vasculaire engendrée par l'IL-6 dans un contexte tridimensionnel et un environnement matriciel.

Les HUVEC ne possédant pas le récepteur IL-6R, elles ne réagissent pas à la présence de l'IL-6 seule. Pour que les HUVEC répondent à la cytokine il faut que celle-ci soit associée à la forme soluble du récepteur, sIL-6R, afin que la cytokine puisse se lier à la protéine gp130 et déclencher la voie de signalisation JAK/STAT, ce qu'on appelle la trans-signalisation [263]. L'hétérodimère synthétique, hyper IL-6, est un bon outil pour étudier cette trans-signalisation puisqu'il reproduit la structure du complexe IL-6/sIL-6-R avec une affinité très forte pour gp130 [264], [265]. De plus, l'équipe avec qui nous avons collaboré pour ces travaux a développé des variants de l'IL-6 qui permettent de moduler l'activation de la voie STAT1 et STAT3 en jouant sur l'affinité des variants avec gp130 [266]. L'intérêt de notre modèle est de pouvoir donner une réponse quant à l'activité fonctionnelle de ces variants sur une monocouche endothéliale dans une configuration de vaisseaux sur puce.

Les premiers travaux réalisés dans le cadre de cette collaboration ont donc été de vérifier les effets de l'hyper IL-6 en termes d'activation de la monocouche endothéliale et de perméabilité vasculaire. Nous avons ensuite utilisé les variants de l'IL-6 pour observer leurs effets sur la perméabilité des vaisseaux sur puce.

### 3.3.3.2 Influence de l'hyper IL-6 sur la réponse en activation et en perméabilité

Dans un premier temps, l'effet de l'hyper IL-6 sur la réponse en activation a été étudié dans notre modèle. Les vaisseaux sur puce ont été stimulés avec du TNF $\alpha$ , de l'IL-6 et de l'hyper IL-6 à différentes concentrations. La réponse fonctionnelle a ensuite été mesurée après injection de monocytes humains THP-1 marqués à la calcéïne AM par voie intraluminaire et leur adhérence à l'endothélium a été quantifiée. Pour la dose la plus faible d'IL-6 et d'hyper IL-6, presque aucune adhérence des cellules circulantes a été constatée (Figure 3-81 et Figure 3-82). Une réponse a été observée pour des doses d'IL-6 et d'hyper IL-6 de 100nM et, comme décrit dans *J. Martinez-Fabregas et al.*[265], celle induite avec l'hyper IL-6 était plus importante que celle obtenue avec l'IL-6.

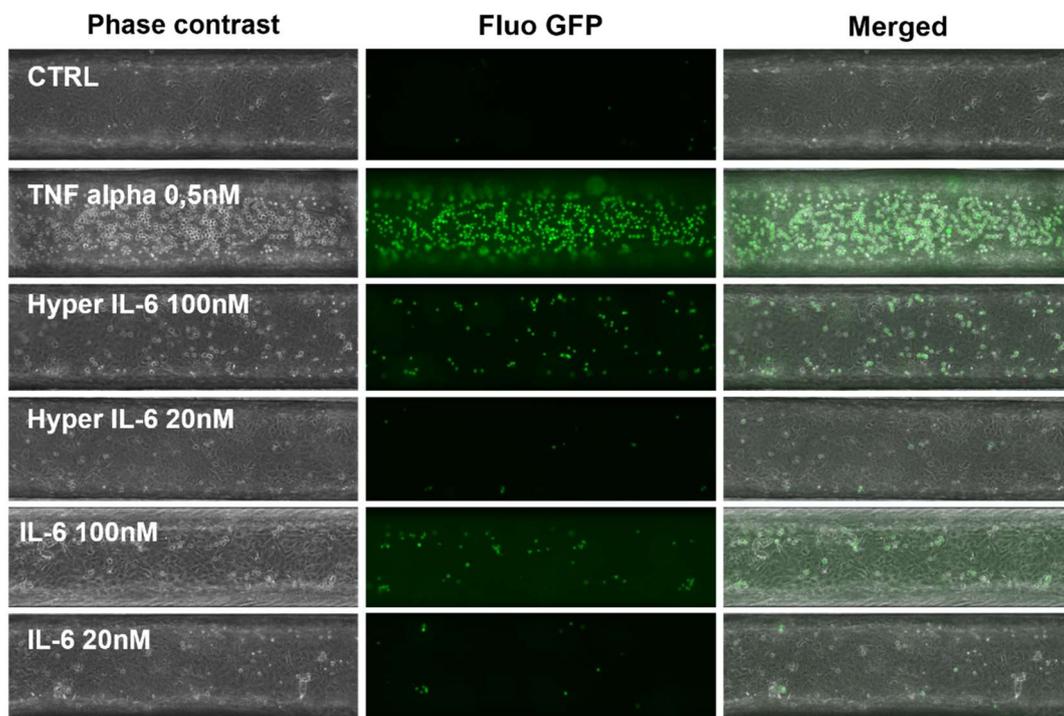


Figure 3-81 Images en fluorescence et contraste de phase de cellules immunitaires adhérentes aux cellules endothéliales dans les vaisseaux sur puces activés. Les vaisseaux constitués d'HUVEC ont été stimulés ou non avec du TNF $\alpha$  (TNF alpha), de l'Hyper IL-6 ou de l'IL-6 (IL6) pendant 4h, puis des monocytes (THP-1) marqués à la calcéïne AM (vert) ont été injectés dans les lumens et laissés à adhérer sur la face luminale de l'endothélium. CTRL; vaisseau non traité. Après rinçages, les vaisseaux ont été imagés en contraste de phase et en fluorescence.

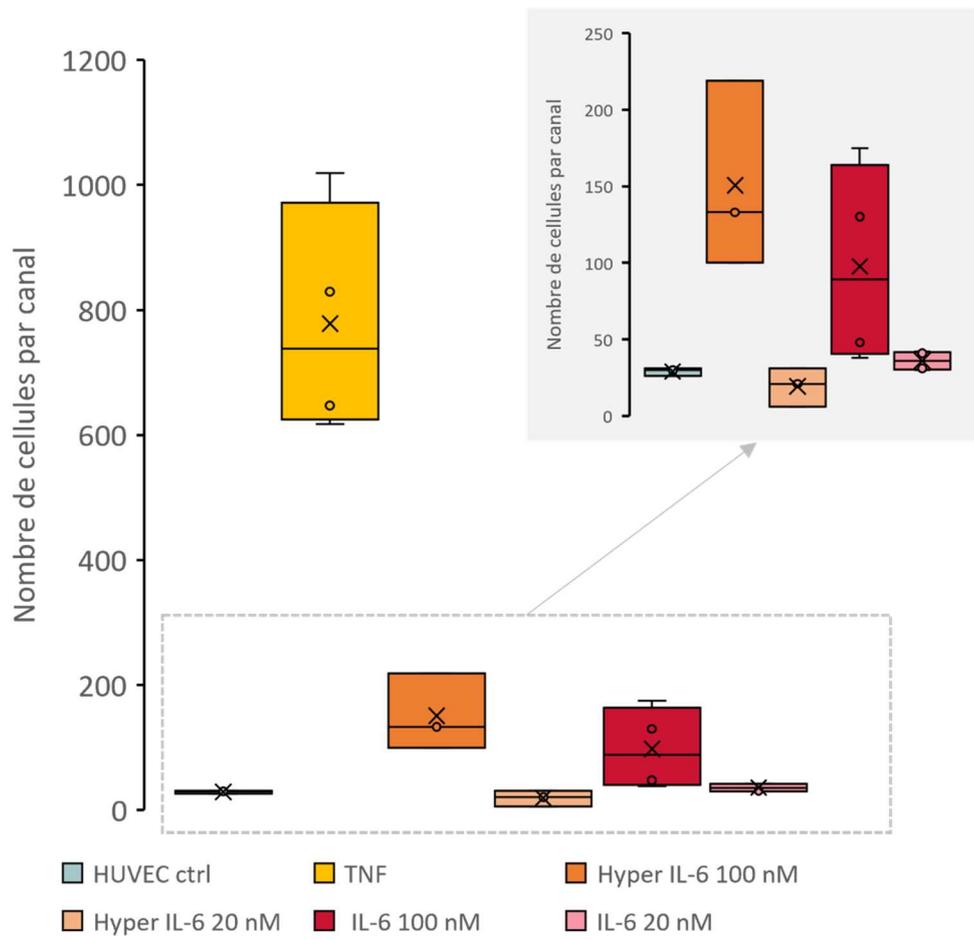


Figure 3-82 Quantification sur toute la longueur des canaux du nombre de cellules immunitaires attachées aux parois des vaisseaux, n=4.

La réponse fonctionnelle en activation en présence d'hyper IL-6 dans nos vaisseaux sur puce correspondait donc bien à celle attendue. Ensuite et afin de quantifier l'effet de l'IL-6 et de l'hyper IL-6 sur la perméabilité vasculaire dans les vaisseaux sur puce, nous avons mesuré la diffusion de dextran-70kDa, comme précédemment, après stimulation par ces cytokines. La perméabilité induite par l'hyper IL-6 est apparue bien plus élevée que celle provoquée par l'IL-6 (Figure 3-83 et Figure 3-84). Cette expérience a été reproduite une seconde fois et les résultats ont été similaires.

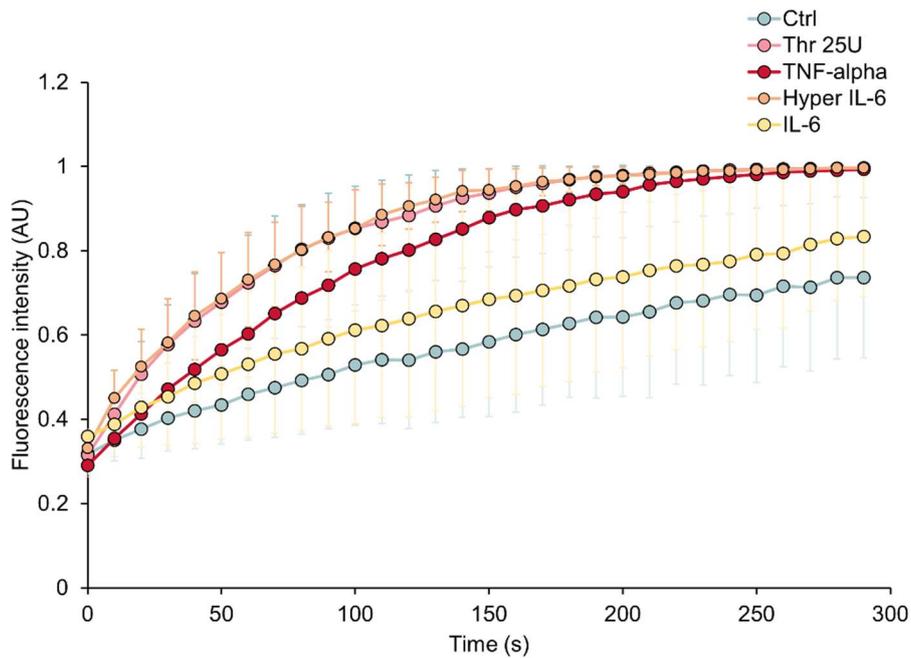


Figure 3-83 Diffusion de dextran-70 kDa Texas Red dans la couche de collagène en fonction du temps à l'intérieur d'un canal de 1 mm de large, mesuré à partir d'images de vidéomicroscopie fluorescente, n=4 microvaisseaux par conditions, 1 point toutes les 10s a été extrait des mesures 3 images/s en temps réel. Ctrl; vaisseaux non traités, Thr, Thrombine

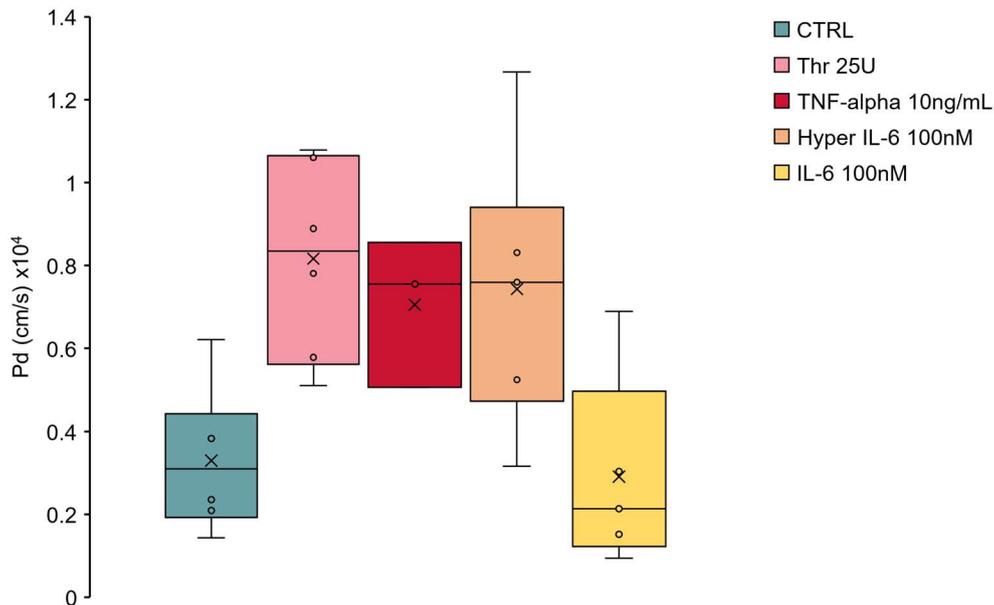


Figure 3-84 Coefficients de perméabilité diffusives calculés. n=4 microvaisseaux par conditions. CTRL; vaisseaux non traités, Thr, Thrombine

Les vaisseaux utilisés dans le test de perméabilité ont finalement été immunomarqués pour la VE-cadhérine puis imagés par microscopie confocale. Les projections d'intensité maximale obtenues ont montré dans le cas du TNF $\alpha$  comme dans celui de l'hyper IL-6 une nette perturbation de la jonction, alors que pour la stimulation avec l'IL-6, la jonction adhérente n'a pas semblé avoir été affectée (Figure 3-85).

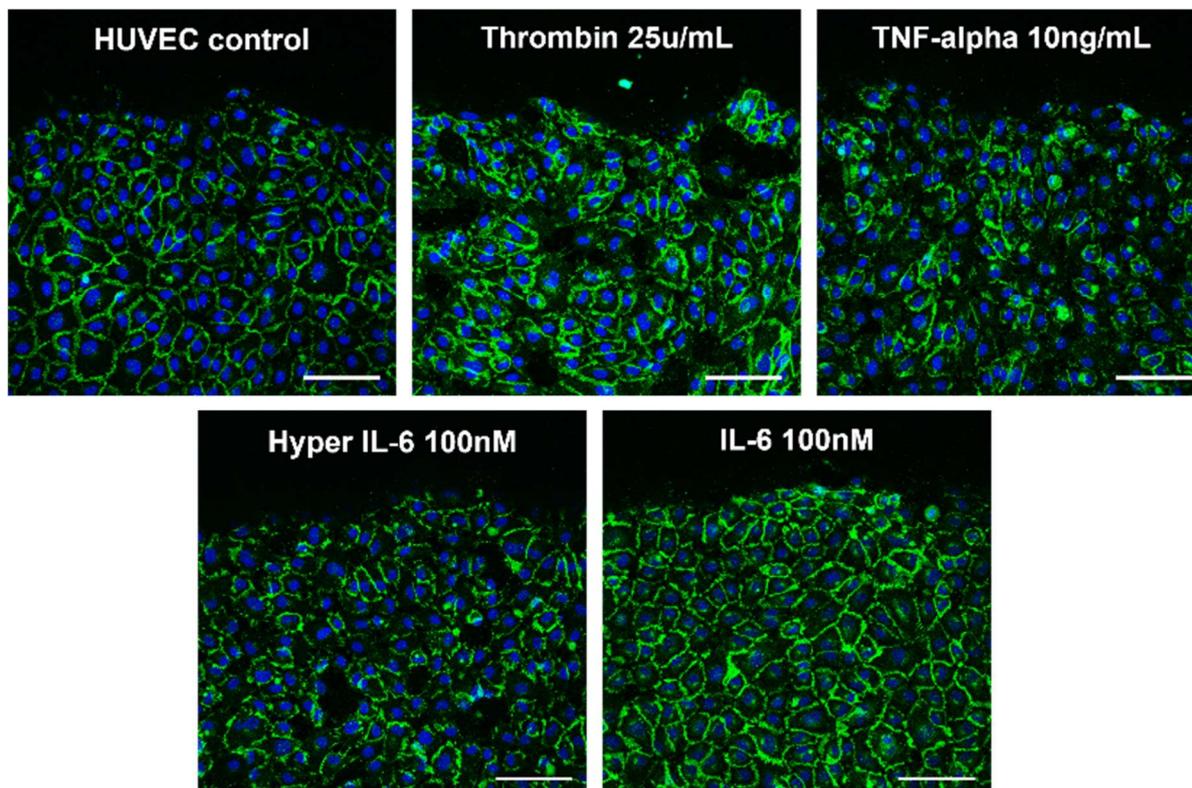


Figure 3-85 Images en microscopie confocale des vaisseaux sanguins après les tests de perméabilité. Les vaisseaux ont été marqués pour la VE-cadhérine (vert) et les noyaux ont été colorés au DAPI (bleu). Projection d'intensité maximale de l'axe Z, barre=100µm. control: vaisseau non traité.

L'hyper IL-6 a donc bien montré un effet perméabilisant plus puissant que celui de l'IL-6.

L'ensemble des résultats ci-dessus a bien confirmé que les HUVEC ne répondaient pas à l'IL-6 seule. D'autre part, ils ont validé la réponse en activation de la monocouche endothéliale ainsi que l'augmentation de la perméabilité vasculaire en présence d'hyper IL-6.

### 3.3.3.3 Effets de variants de l'IL-6 sur la perméabilité vasculaire

Après avoir montré que les vaisseaux sur puce répondaient bien à l'hyper IL-6, nous avons étudié leur réponse aux variants évoqués précédemment et développés par l'équipe avec laquelle nous avons collaboré. Les vaisseaux ont été stimulés avec les variants C7 et Mut3 à une concentration de 100nM pendant 4h. Le test de perméabilité avec le dextran-70 kDa a ensuite été réalisé sur ces vaisseaux. Mut3 a provoqué une perméabilisation équivalente à l'hyper IL-6, alors que le coefficient de perméabilité diffusives de C7 s'est révélé sensiblement inférieur. Les résultats sont en accord avec *Martinez-Fabregas et al.* [266] pour mut3 mais pas pour C7 pour lequel une réponse plus élevée était attendue.

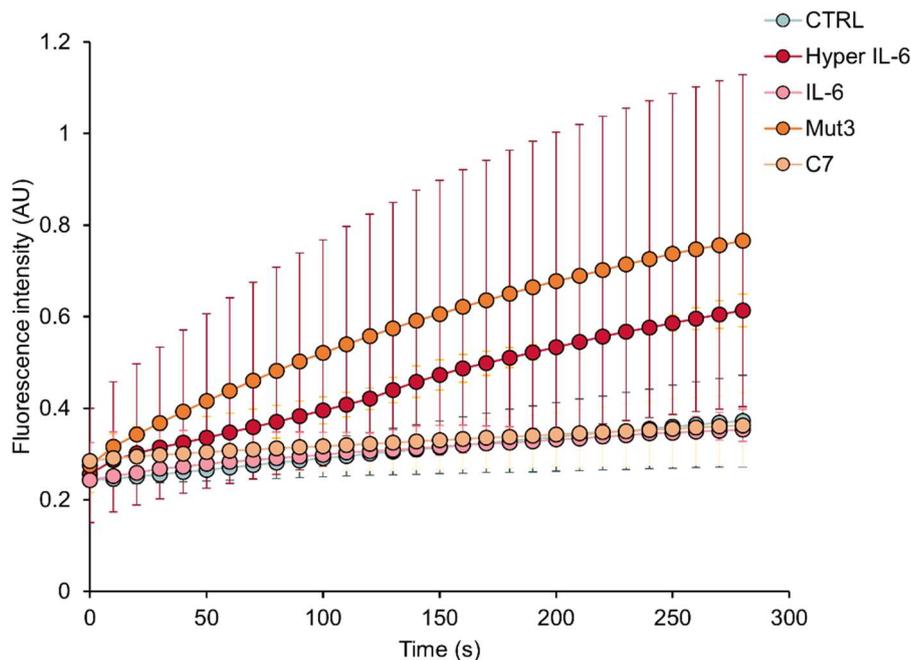


Figure 3-86 Diffusion de dextran-70kDa Texas Red dans la couche de collagène en fonction du temps à l'intérieur d'un canal de 1 mm de large, mesuré à partir d'images de vidéomicroscopie fluorescente, n=5 microvaisseaux par conditions, 1 point toutes les 10s a été extrait des mesures 3 images/s en temps réel. CTRL; vaisseaux non traités.

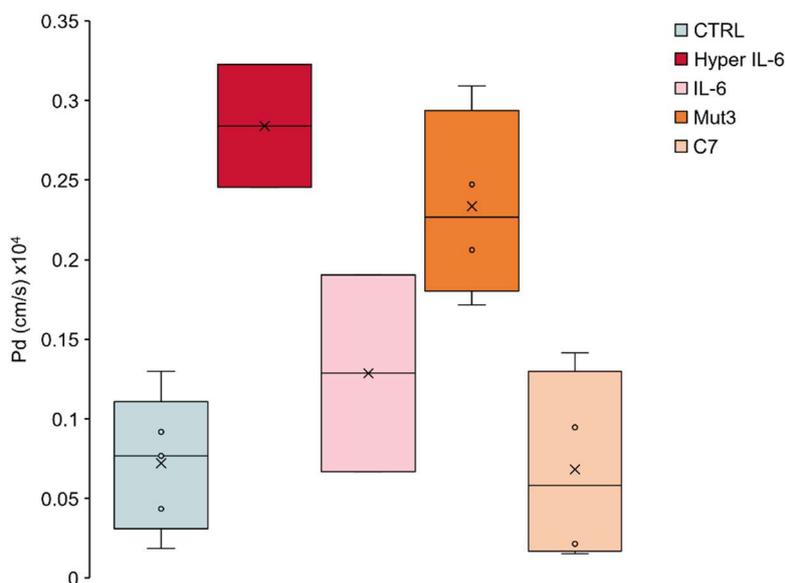


Figure 3-87 Coefficients de perméabilité diffusifs calculés. n=5 microvaisseaux par conditions. CTRL; vaisseaux non traités.

Nos approches de vaisseaux sur puce ont donc permis d'évaluer la réponse globale d'une monocouche endothéliale 3D à la présence de variants de l'IL-6. Ces observations n'ont été réalisées qu'une seule fois et méritent donc d'être reproduites.

En conclusion de cette section, nos modèles constituent donc un bon outil pour l'étude de l'hyper perméabilité induite par des cytokines. Les résultats obtenus avec l'IL-6 et ses variants vont dans le

même sens que ceux obtenus par l'équipe collaboratrice sur les voies d'activation impliquées et complètent ainsi leur étude en apportant des observations fonctionnelles dans un contexte vasculaire tridimensionnel.

### 3.3.4 Effet d'inhibiteurs de tyrosine kinase sur la perméabilité vasculaire (Equipe David Tulasne – CANTHER)

#### 3.3.4.1 Thérapies ciblant les récepteurs MET

Le récepteur à tyrosine kinase *Mesenchymal Epithelial Transition* (MET) et son ligand l'*Hepatocyte Growth Factor* (HGF) sont aujourd'hui la cible de nombreuses thérapies anticancéreuses en cours de développement, notamment dans le cas du cancer du poumon [267], [268]. Parmi les effets secondaires identifiés et répandus de ces thérapies observés chez les patients, on compte les fuites vasculaires et les œdèmes [268]. L'équipe, qui nous a contacté pour cette collaboration souhaitait utiliser notre modèle de vaisseaux sur puce pour évaluer la perméabilité vasculaire induite par les inhibiteurs de tyrosine kinase (TKI) utilisés couramment en clinique pour traiter les patients.

Les travaux préliminaires présentés dans cette section concernent l'influence du ligand de ces récepteurs, l'HGF, sur la fonction barrière de la monocouche endothéliale. Pour cela nous avons fabriqué des vaisseaux sur puce à partir de deux sources cellulaires, les HUVEC qui sont notre modèle robuste et les HMVEC-L qui apportent un contexte d'endothélium pulmonaire.

#### 3.3.4.2 Influence de l'HGF sur la perméabilité vasculaire

Des vaisseaux sur puce constitués d'HUVEC ou d'HMVEC-L ont été stimulés avec 10ng/ml d'HGF pendant 4h, puis, le test de perméabilité avec la diffusion du dextran-70kDa a été réalisé. L'HGF a semblé avoir un effet positif sur la barrière endothéliale avec une diminution du coefficient de perméabilité diffusives pour les deux sources cellulaires après stimulation par ce facteur (Figure 3-88 et Figure 3-89), en accord avec *F. Liu et al.* et *Yang et al.* [269], [270].

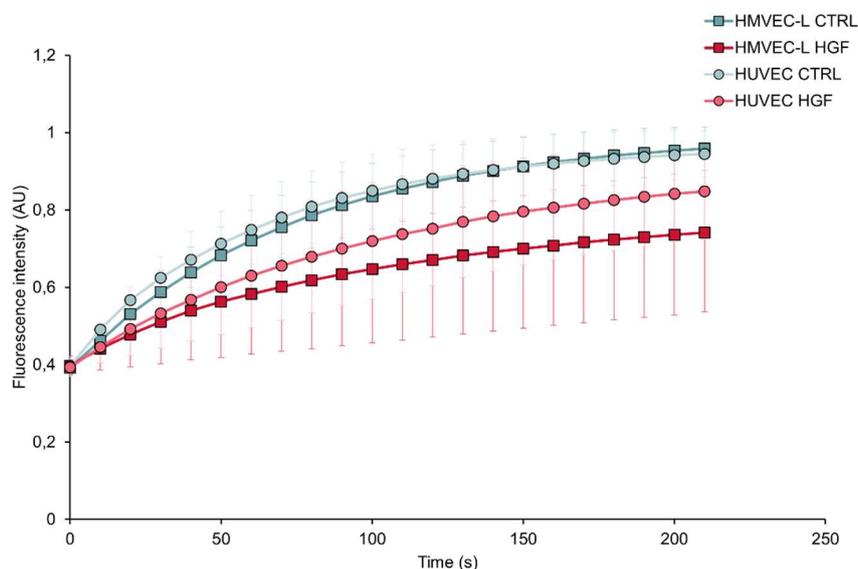


Figure 3-88 Diffusion de dextran-70kDa Texas Red dans la couche de collagène de vaisseaux composés d'HUVEC ou d'HMVEC-L en fonction du temps à l'intérieur d'un canal de 1 mm de large, mesuré à partir d'images de vidéomicroscopie fluorescente, n=3 microvaisseaux par conditions, 1 point toutes les 10s a été extrait des mesures 3 images/s en temps réel. CTRL; vaisseaux non traités, HGF; vaisseaux traités avec 10ng/ml d'HGF pendant 4h.

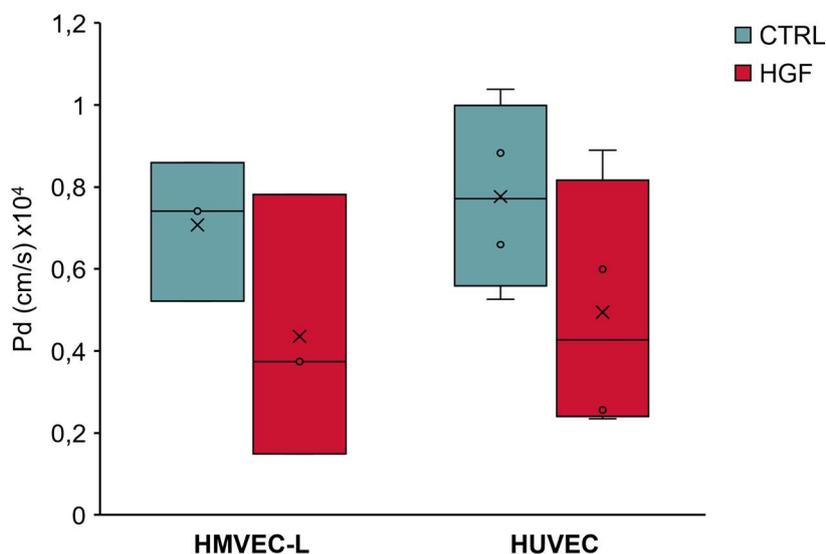


Figure 3-89 Coefficients de perméabilité diffusive calculés sur les vaisseaux composés d'HUVEC ou d'HMVEC-L. n=3 microvaisseaux par conditions. CTRL; vaisseaux non traités, HGF; vaisseaux traités avec 10ng/ml d'HGF pendant 4h.

Ces résultats préliminaires ont montré que les monocouches d'HUVEC, comme celles d'HMVEC-L, voyaient leur perméabilité diminuer en présence d'HGF. La suite de ces travaux consistera à évaluer l'impact d'inhibiteurs de l'activité tyrosine kinase de MET sur les vaisseaux sur puce en présence ou non d'HGF.

### 3.3.5 Bilan des applications explorées pour nos vaisseaux sur puce

Les différents résultats présentés dans cette partie ont montré la versatilité de notre modèle. En effet, nous avons pu adresser des questions fondamentales comme l'effet de la transfection d'un anti-miR d'intérêt sur la jonction adhérente ou la surexpression du gène SNAIL-1 dans des HUVEC. Ces deux études ont montré au passage la possibilité d'utiliser des cellules endothéliales génétiquement modifiées dans nos modèles. Nous avons également exploré des questions plus fonctionnelles comme l'apparition de fuites vasculaires comme effet secondaires constatés dans le cadre des immunothérapies et de thérapies reposant sur les inhibiteurs de MET.



# *Chapitre 4 :*

# *Discussion et*

# *perspectives*



Au départ de ce projet, nous avons l'ambition de reproduire une interface endothélium/lumen d'un vaisseau sur puce fonctionnelle, perfusée et biologiquement valide dans un format utilisable pour le criblage de molécules. Globalement, ces objectifs ont bien été atteints à l'issue de ces trois ans. Ce travail nous a permis de mettre au point des dispositifs de vaisseaux sur puce dans lesquels un canal initial a été créé avec un hydrogel en utilisant la focalisation en flux et la digitation visqueuse (VFP), cette dernière technique ayant particulièrement été approfondie. Nous sommes parvenus à établir une monocouche confluyente et cohésive de cellules endothéliales, comme à la face interne d'un vaisseau sanguin naturel. L'application de cette technique une seule ou deux fois de suite a permis de varier les dimensions du vaisseau final et aussi de générer une double couche cellulaire. Ces vaisseaux sont caractérisables en microscopie, ce qui a notamment permis d'évaluer la qualité des jonctions adhérentes et des jonctions serrées. D'autre part, la perméabilité de l'endothélium a été étudiée par la mise en place d'une approche de vidéomicroscopie en temps réel. Nous avons montré que ces vaisseaux étaient activables par des cytokines pro-inflammatoires. D'autre part, la technique du double VFP nous a permis de fabriquer des vaisseaux constitués de deux couches cellulaires distinctes et concentriques afin d'approcher encore plus fidèlement la structure et la composition d'un vaisseau sanguin naturel. Enfin, ces vaisseaux-sur-puce ont été conçus dans un format standardisé de plaque multi-puits dans le but d'être utilisés pour le criblage robotisé et à haut débit de médicaments.

## 4.1 PERTINENCE BIOLOGIQUE DES VAISSEaux SUR PUCE FABRIQUES

---

### 4.1.1 Pertinence biologique d'une multicouche cellulaire

L'amélioration la plus significative que notre approche permet d'atteindre par rapport aux méthodes existantes de fabrication de vaisseaux sanguins sur puce est l'ensemencement des deux principaux types de cellules vasculaires dans des couches circulaires concentriques, comme on peut l'observer dans les vaisseaux sanguins naturels. Amener les cellules périvasculaires en fine apposition avec les cellules endothéliales est un point important lors de la fabrication de vaisseaux sur puce. Dans les vaisseaux sanguins naturels, les cellules périvasculaires sont situées du côté abluminal des cellules endothéliales. Elles produisent des facteurs de survie, de différenciation et un environnement matriciel favorable aux cellules endothéliales et jouent donc un rôle crucial dans le maintien de vaisseaux sanguins quiescents et stables *in vivo* [254]. Les approches précédentes de vaisseaux sur puce intégrant des cellules périvasculaires consistaient à les mélanger à l'hydrogel entourant les couches endothéliales [80], [131] ou à créer des couches mixtes de cellules endothéliales et périvasculaires [217]. Ces deux approches, bien qu'intéressantes, ne sont pas satisfaisantes d'un point de vue structurel. En effet, dans le premier cas, les modèles n'aboutissent pas à une apposition étroite et proche des deux types cellulaires, les périvasculaires étant noyées dans l'hydrogel. Dans la seconde approche, la couche mixte de cellules endothéliales/périvasculaires produit un mélange des deux types cellulaires au sein d'une même couche hétérogène. Cette situation n'est pas en accord avec la situation naturelle et compromet vraisemblablement l'intégrité de la monocouche endothéliale.

Notre approche permet de rapprocher les deux couches cellulaires sous forme de strates distinctes, en les maintenant séparées par une fine couche de collagène qui imite la lame basale naturelle. De façon tout à fait intéressante, les cellules NHLF ont bien adopté ici une morphologie typique de péricytes en forme d'étoile, avec des filopodes qui semblent entrer en contact avec les

cellules endothéliales, comme dans les vaisseaux capillaires naturels [271]. Afin de valider ce point, nous avons mis au point le marquage de la N-cadhérine pour visualiser ces points de jonctions entre cellules endothéliales et périvasculaires [272], ceci étant toujours en cours de réalisation. Néanmoins, cet aspect morphologique ajouté au fait que la présence de ces cellules renforce l'intégrité des jonctions suggèrent que les fibroblastes intégrés à nos modèles se comportent effectivement comme des péricytes.

Les ratios fibroblastes:cellules endothéliales (F:EC) exprimés dans ce travail correspondaient aux proportions effectives au moment de l'ensemencement des vaisseaux. Etant donné que les analyses en perméabilité ont été réalisées plusieurs jours après cet ensemencement, nous n'avons pas de certitude absolue sur la conservation de ces ratios au cours du temps. Il s'avère d'autre part assez difficile de dénombrer avec précision chacun des types cellulaires en raison de la configuration 3D. Toutefois, les images de microscopie confocale semblent indiquer que les fibroblastes prolifèrent assez peu dans le collagène. Les cellules endothéliales, pour leur part, sont quiescentes à confluence, ceci laisse donc supposer que la proportion des types cellulaires est restée sensiblement la même entre le moment de l'ensemencement et celui du test de perméabilité.

Comme pour d'autres études, le choix d'utiliser des fibroblastes comme source de cellules périvasculaires dans la fabrication de vaisseaux sur puces nous a semblé pertinent car, entre autres, les péricytes dérivent majoritairement du mésothéliome au cours du développement embryonnaire *in vivo* [254]. D'autre part, les fibroblastes sont également connus pour favoriser la formation de la lumière des vaisseaux sanguins *in vitro*, en raison de la production de protéines matricielles [273]. Plus spécifiquement, les fibroblastes pulmonaires ont historiquement démontré leur pertinence dans les dispositifs de vaisseaux sur puce pour leur capacité à soutenir l'autoassemblage des cellules endothéliales en réseaux tubulaires et à augmenter les fonctions de barrière des vaisseaux [274], [275]. Enfin, une étude récente utilisant des fibroblastes d'origines diverses a montré que ceux issus du tissu pulmonaire, tels que ceux utilisés ici, étaient les plus indiqués en tant que cellules de soutien pour les modèles vasculaires 3D [276].

#### 4.1.2 Réponse en activation des vaisseaux sur puce

L'intégration de cellules vivantes dans un environnement artificiel hors du contexte de leur tissu d'origine pose très clairement le problème de la pertinence biologique de ces conditions. En effet, les risques sont multiples ; les conditions physico-chimiques différentes, le manque éventuel d'un partenaire cellulaire, l'absence de signaux biologiques environnementaux (hormones, facteurs de croissance, matrice extracellulaire, etc.) peuvent conduire à l'apparition d'artéfacts comportementaux (dédifférenciation, transdifférenciation, mort cellulaire, etc.). Il est donc crucial de valider biologiquement les structures tissulaires fabriquées dans les vaisseaux sur puce.

La confirmation de l'activation des vaisseaux sur puce suite à la stimulation par des cytokines pro-inflammatoires est l'une des façons de les valider fonctionnellement. Il s'agit d'une réponse classique, essentiellement régulée par les cellules endothéliales, qui a été bien reproduite dans nos dispositifs. Tout d'abord, il est intéressant de constater que la mise en culture en puce des cellules endothéliales dans nos conditions n'entraîne pas d'activation spontanée de ces cellules. Ceci est un point important dans la mesure où le but était de générer des vaisseaux initialement stables et « non activés » pour pouvoir, justement, étudier leur réponse à l'inflammation. Ensuite, au niveau fonctionnel, une

augmentation marquée du nombre de leucocytes adhérant à la face luminale de l'endothélium des vaisseaux sur puce a été observée à la suite d'une stimulation par le TNF $\alpha$  ou l'IL-1 $\beta$ , ce qui valide la possibilité d'activer ces vaisseaux en réponse à une situation proinflammatoire.

Au niveau de l'expression de gènes, une augmentation significative des niveaux d'expression de trois des principaux récepteurs d'adhérence leucocytaire exprimés par les cellules endothéliales et de nombreux autres facteurs a été observée à la suite d'une stimulation par le TNF $\alpha$ . Les variations des niveaux d'expression des gènes analysés correspondaient à celles classiquement observées dans les HUVEC, allant d'une augmentation de dix à mille fois après stimulation par le TNF $\alpha$  [277] ou à une réduction jusqu'à 100 fois pour ceux régulés à la baisse. Cette analyse a été rendue possible par le fait que nous avons mis au point les conditions pour extraire les acides nucléiques à partir de chaque vaisseau individuellement et pour les purifier séparément. Chaque extrait a ensuite pu être analysé pour évaluer les niveaux d'expression de centaines de gènes avec une grande précision à l'aide de la technologie qPCR Taqman. Il s'agit d'une amélioration intéressante car la plupart des autres approches sur puce nécessitent de détruire le dispositif pour récupérer les cellules, avec le risque de dégrader le vaisseau ou de récupérer un nombre insuffisant de cellules à partir de puces individuelles.

Enfin, un autre point à signaler est le fait que dans nos conditions, nous n'avons pas observé de bourgeonnement de type angiogénique depuis les vaisseaux d'HUVEC conservés jusqu'à 10 jours en culture, ce qui contribue à renforcer l'hypothèse selon laquelle nos vaisseaux sont stables et quiescents en conditions non stimulés. Dans les études précédentes de l'équipe, l'angiogenèse spontanée a posé de réels problèmes de mise au point des conditions de culture des vaisseaux sur puce et a nécessité de modifier la composition du milieu de culture utilisé pour entretenir ces vaisseaux avant stimulation angiogénique [208].

#### 4.1.3 Réponse en perméabilité vasculaire

Toujours dans l'optique de valider biologiquement nos vaisseaux sur puce, nous avons adressé la caractérisation de la barrière vasculaire. En ce qui concerne l'endothélium naturel, l'intégrité de la monocouche est principalement due, d'une part, à la bonne adhérence des cellules endothéliales à la lame basale et, d'autre part, à la formation de jonctions adhérentes et de jonctions serrées [171]. Dans les vaisseaux sanguins, la VE-cadhérine est le principal composant structurel impliqué dans la formation et le maintien des jonctions adhérentes. Les interférences dans les interactions moléculaires entre la VE-cadhérine des cellules endothéliales voisines conduisent à une perméabilité vasculaire [278]. Il est donc attendu que les jonctions adhérentes soient bien formées dans les vaisseaux sur puce et que ces derniers soient sensibles aux agonistes de perméabilité naturelle tels que la thrombine. Dans nos modèles, les cellules endothéliales tapissant la face interne des lumières ont montré une distribution continue de VE-cadhérine aux jonctions intercellulaires, indiquant une monocouche confluyente correctement établie comme celle trouvée *in vivo* dans les vaisseaux sanguins au repos [171]. Il a été démontré que la stimulation des cellules endothéliales par la thrombine modifiait la localisation de la VE-cadhérine, induisait sa dissociation de la  $\beta$ -caténine, perturbait les jonctions adhérentes et ouvrait des espaces entre les cellules endothéliales [200]. Nos vaisseaux sanguins sont pleinement sensibles à la thrombine qui induit un relâchement dose-dépendant des jonctions inter-endothéliales ainsi qu'une redistribution de la VE-cadhérine de manière similaire et, en conséquence, une augmentation corrélée de la perméabilité vasculaire.

Dans les vaisseaux sanguins, la présence de péricytes réduit la perméabilité de l'endothélium, alors que l'absence de péricytes induit une vascularisation plus fuyante et mal organisée [271]. Dans les vaisseaux 3D développés dans ce travail, les fibroblastes pulmonaires ont semblé remplacer fonctionnellement les péricytes car l'ajout de NHLF a augmenté considérablement l'étanchéité de la barrière vasculaire et a diminué la réponse aux doses de thrombine. Nous n'avons pas déterminé quels facteurs ou molécules matricielles normalement exprimés par les péricytes ont été produits par les NHLF pour stabiliser les jonctions endothéliales. D'autre part, nous ne savons pas si ces facteurs étaient exprimés spontanément par les NHLF ou si la présence des cellules endothéliales a induit un changement phénotypique des NHLF vers les péricytes, ces points seraient très intéressants à étudier.

L'approche de double VFP a permis de moduler le rapport cellules périvasculaires:cellules endothéliales de manière à imiter différentes situations observées dans les structures vasculaires. En effet, ce ratio varierait de 1:1 dans la rétine à 1:100 dans les muscles squelettiques [271], bien que ces chiffres exacts restent encore controversés [254]. Ici, une augmentation marquée de l'intégrité de la barrière vasculaire a été observée lorsque le rapport F:EC était élevé. Ceci est en accord avec le fait qu'une carence en péricytes peut provoquer une augmentation de la perméabilité des vaisseaux cérébraux, en corrélation directe avec la densité des péricytes associés aux vaisseaux [279], [280]. Une couverture péricytaire défectueuse induit également une vascularisation mal organisée et fuyante dans les tumeurs [281].

#### 4.1.4 Perfusion dynamique des modèles

Un des critères que nous nous étions fixés au début de ce travail était de perfuser dynamiquement nos vaisseaux sur puce. Plusieurs essais préliminaires ont été réalisés avec une chaîne microfluidique automatisée que nous avons récemment composée en utilisant des contrôleurs de pression négative. Cependant, la mise en œuvre de la perfusion n'a pas encore pu être finalisée de manière fiable et robuste, notamment à cause de la formation intempestive de bulles d'air au sein des tubes microfluidiques. Toutefois, nous avons déjà préparé les outils pour l'analyse moléculaire de l'effet d'une telle mise en flux sur les cellules endothéliales, notamment avec la mise au point du marquage de la péricentrine et l'analyse de l'expression des gènes régulés par le flux (KLF2 et NOS3) [282].

L'absence de flux a particulièrement affecté les expériences d'adhérence de cellules immunes et cancéreuses aux vaisseaux. Celles-ci ayant été réalisées jusqu'à présent uniquement en condition statique, une sédimentation des THP-1 et de MDA-MB-231 a été constatée sur la partie inférieure du lumen. Il est attendu que la réalisation des essais en conditions de flux dynamique permettra d'observer une adhérence sur toute la circonférence de l'endothélium.

L'établissement du flux dans les vaisseaux est une condition *sine qua non* pour la pertinence biologique de ce modèle. En effet, le flux ne permet pas uniquement aux cellules circulantes d'interagir avec l'endothélium, il permet aussi l'apport de nutriments et d'oxygène et recrée les forces de cisaillements imposées naturellement aux cellules. Ces forces induisent des réponses cellulaires spécifiques ; une réorganisation du cytosquelette, une orientation des cellules dans le sens du flux, et une régulation transcriptionnelle [283] qui sont impossibles à reproduire en l'absence de flux. Enfin la connexion de ces vaisseaux à un système fluide nous permet d'envisager une distribution automatisée des molécules à tester dans la perspective des criblages de médicaments.

## 4.2 FABRICATION DES VAISSEAUX

---

### 4.2.1 Parallélisation des vaisseaux sur puce

L'un des principaux avantages du VFP dans nos conditions est qu'il permet la fabrication simultanée de 48 vaisseaux sanguins sur le même dispositif, une échelle presque impossible à atteindre avec d'autres technologies utilisant des modèles sacrificiels, la bio-impression ou l'ablation laser [284]. Toutefois, jusqu'à présent, le processus de formation des vaisseaux via VFP n'a pas permis un contrôle strict de leur géométrie et les vaisseaux montrent certaines irrégularités de diamètre sur leur longueur. Ils ne sont pas parfaitement cylindriques comme ceux réalisés grâce à des moules sacrificiels tels que des aiguilles [131], [208], [250]. Bien que cela ne pose pas de problème pour l'étude des fonctions de la barrière endothéliale, cela pourrait conduire à des incohérences si nous envisagions de les utiliser pour des études d'aspects liés au flux qui dépendent très sensiblement des dimensions des vaisseaux. Pour ces applications, il est nécessaire de travailler avec des vaisseaux homogènes et bien standardisés. En effet, la fabrication de vaisseaux de section circulaire influence les conditions d'écoulement, les canaux ronds permettant, par exemple, une meilleure répartition des forces de cisaillement que les canaux rectangulaires [285]. Les vaisseaux cylindriques 3D miment mieux la situation naturelle en ce qui concerne l'exposition des tissus aux forces physiques sous perfusion.

Un point marquant de la géométrie de nos vaisseaux réalisés par VFP est qu'ils ne sont pas parfaitement ronds mais ovales. Ceci peut s'expliquer par la plus grande hydrophilie du verre par rapport au PDMS qui fait que le lumen a tendance à se former sur la face inférieure du canal, au plus près de la lamelle de verre. L'effet de la gravité peut accentuer ce phénomène [153]. De plus nous travaillons avec un collagène légèrement moins concentré (3mg/mL) que d'autres études (environ 5mg/mL), la différence de viscosité entre la solution de collagène et le milieu de culture est donc plus faible, influençant la forme finale doigt de Saffman Taylor [153]. Enfin, contrairement à la littérature [158], nous n'avons pas constaté d'effet notable du volume de la goutte déposée en entrée du canal ou du volume de collagène restant en sortie sur la taille du doigt généré par VFP. Ceci est probablement dû au fait que la géométrie de nos vaisseaux présente une certaine variabilité qui ne permet peut-être pas d'apprécier l'effet de ces paramètres.

D'un point de vue biologique, la structure cellulaire de nos modèles multicouches reproduit celle de capillaires sanguins matures, avec une proportion de cellules périvasculaires assez faible et l'absence de couche musculaire lisse pluricellulaire bien distincte [286]. Cependant, leurs dimensions (200-700 $\mu$ m) sont plus grandes que celles des capillaires naturels (environ 10 $\mu$ m) et s'approchent plus de veinules ou d'artérioles (environ 100-500 $\mu$ m). Ceci est inhérent aux dimensions de canaux de PDMS utilisés et dans la mesure où nous visons à reproduire une interface endothéliale qui permet d'étudier l'activation et la perméabilité vasculaire, ces divergences ne nous semblent pas poser de problème majeur de pertinence biologique.

Afin de paralléliser le processus de fabrication des lumens et d'améliorer sa fiabilité pour une montée en échelle nous développons actuellement une approche automatisée pour la fabrication de vaisseaux sanguins à l'aide d'un robot de laboratoire open source et personnalisé. En effet, la technique VFP étant principalement basée sur des techniques de pipetage dans des microcanaux elle peut être robotisée. L'automatisation permettra en effet d'augmenter encore la reproductibilité du

processus par rapport au pipetage manuel, de gagner du temps et d'améliorer le contrôle des dimensions, car tous les paramètres seront plus étroitement régulés (volume et vitesse d'injection).

#### 4.2.2 Diversification de la matrice et des modèles cellulaires

L'établissement d'OoCs et, *a fortiori* de vaisseaux sur puce, demande la maîtrise particulière du microenvironnement cellulaire et notamment matriciel. Les matrices biologiques généralement utilisées (Matrigel, collagène, fibrine, etc.) présentent de bonnes qualités en tant que substrats d'adhérence cellulaire mais sont, par définition, variables d'un lot à l'autre. Il apparaît donc très intéressant de pouvoir utiliser des matrices artificielles avec de meilleurs critères de reproductibilité, tout en offrant des propriétés biologiques similaires aux matrices naturelles. Pour la mise au point de nos modèles, nous avons principalement utilisé du collagène de type I, qui a déjà été intégré sous forme d'hydrogel à de nombreux autres OoCs [23], dont certains précédemment fabriqués par l'équipe [208], [250] et qui montre globalement d'excellentes qualités matricielles. Nous avons également tenté de fabriquer des vaisseaux à l'aide de l'*hydroscaffold* d'acide hyaluronique Biomimesys, notamment en raison de sa composition relativement définie, des caractéristiques affichées comme la possibilité d'y greffer des peptides dérivés du collagène, des laminines, etc. et de pouvoir contrôler sa rigidité finale *via* le procédé chimique de fabrication. Cependant, nos essais ont montré que l'établissement d'une monocouche endothéliale n'était pas possible dans ce matériau seul, rendant son utilisation dans nos dispositifs difficile en l'absence d'hydrogel de complément. L'approche de VFP reste toutefois compatible avec l'utilisation d'hydrogels visqueux pouvant être thermiquement réticulés, il est donc envisageable de l'adapter à d'autres composants matriciels naturels ou artificiels plus prometteurs.

Enfin, les différentes collaborations engagées au cours de ce travail montrent, d'une part, l'intérêt de développer ce genre de modèle et, d'autre part, la nécessité de pouvoir adapter ces vaisseaux sur puce à des contextes cellulaires plus spécifiques. Les HUVEC primaires sont un excellent modèle de cellules endothéliales, robuste et fiable pour la mise au point d'approches non pathologiques de vaisseaux sur puce. Leur origine veineuse et le fait qu'elles proviennent d'un tissu en cours de dégradation (le cordon ombilical après la naissance), n'en font pas un modèle représentatif de toutes les situations vasculaires. Notre modèle a nonobstant montré une certaine versatilité par la possibilité qu'il offre de cultiver d'autres types d'endothelia après la mise au point de leurs conditions spécifiques de culture. Ceci pourrait nous permettre d'envisager la perspective d'utiliser à court terme des hiPSc, des cellules dérivées de patients ou même d'animaux génétiquement modifiés dans ces modèles.

En conclusion de ce travail, nous avons développé un modèle de vaisseau sur puce biologiquement pertinent pour représenter une interface endothéliale vasculaire fonctionnelle, utilisable dans une chaîne microfluidique et une plateforme robotisée pour le criblage de molécules à visée thérapeutique. Malgré les quelques points restant à développer, ce modèle montre de grandes possibilités d'évolution et d'adaptation à de nombreuses situations biologiques normales ou pathologiques.





# Annexes

Annexe 1 : Curriculum vitae Elise Delannoy .....	170
Annexe 2 : Article de conférence, E. Delannoy, A. Treizebre & F. Soncin, «New microfluidic designs for high-throughput analysis of angiogenesis, blood vessel permeability and endothelial activation», MicroTAS proceedings, 845-6, 2020.....	173

## Annexe 1 : Curriculum vitae Elise Delannoy



# Elise DELANNOY

26 ans

0647943344

241 rue Léon Gambetta 59000 Lille

elise10delannoy@gmail.com

[www.linkedin.com/in/elise-delannoy-59000](http://www.linkedin.com/in/elise-delannoy-59000)

Permis B - Véhiculée

### Expériences professionnelles

#### Octobre 2018 à Décembre 2021 - **Doctorante**

**Université de Lille / IEMN UMR 8520** - Projet SMMiL-E

Développement de systèmes microfluidiques de culture cellulaire 3D afin de reproduire des vaisseaux sanguins biomimétiques compatibles avec le criblage haut débit et la culture en flux. La pertinence des modèles a été validée par des analyses biologiques. Un des modèles créés a été appliqué pour tester l'effet de thérapies anticancéreuses sur la perméabilité vasculaire.

**Encadrement :** Fabrice SONCIN (Biologiste), Anthony TREIZEBRE (Physicien)

#### Avril 2018 à Septembre 2018 - **Stagiaire en Recherche et Développement**

**Fluigent** - Le Kremlin Bicêtre, France

Conception et réalisation d'un banc de test automatisé pour la caractérisation de capteurs de pression pour l'instrumentation microfluidique. Implémentation d'un banc de validation pour contrôleur de pression en sortie de production.

#### Mai 2017 à Août 2017 - **Stagiaire en Laboratoire**

**DTU Nanotech** - Copenhagen, Denmark

Caractérisation électrique de nano bio-capteurs. Analyse et synthèse des résultats en vue de l'amélioration du procédé de fabrication. Instrumentation d'un système microfluidique pour des mesures d'impédance (TEER) dans une culture de cellules intestinales.

### Projets Académiques

#### Novembre 2017 à Mars 2018 - **Projet de fin d'étude**

**IEMN UMR 8520** - Villeneuve d'ascq, France

Travail de synthèse et veille technologique sur les micropompes MEMS. Optimisation d'un banc d'essai pour une micropompe électromagnétique développée au sein du laboratoire.

#### 2015 à 2017 - **Chef du Projet PhAR (Pharma Augmented Reality)**

**Ecole Centrale de Lille** - Villeneuve d'ascq, France

Management d'une équipe de 7 étudiants et des relations partenaires (Laboratoire CRISTAL et Pharmacie centrale du CHRU de Lille). Développement d'une application Android pour des lunettes à réalité augmentée et réalisation d'un chariot connecté.

## Diplômes et Formations

- ▶ 2018 à 2021 - **Thèse de Doctorat de l'université** (soutenance prévue le 13 décembre 2021)  
Université de Lille, Ecole doctorale SPI - Villeneuve d'Ascq, France  
**Directeur de thèse :** Fabrice SONCIN, Dominique COLLARD  
**Encadrant :** Anthony TREIZEBRE
- ▶ 2017 à 2018 - **Master Recherche « Systèmes Communicants »**  
Université de Lille - Villeneuve d'Ascq, France  
Introduction aux métamatériaux. Applications des systèmes microfluidiques. Procédés de fabrication pour les Micro et Nanotechnologies.
- ▶ 2015 à 2018 - **Diplôme d'Ingénieur**  
Ecole Centrale de Lille - Villeneuve d'Ascq, France  
**Parcours généraliste :** Électronique, Mécanique du solide/des fluides, Sciences des matériaux, Programmation, Gestion de projet, Management.  
**Option d'approfondissement :** « Ondes, Micro Nanotechnologies et Télécommunications »
- ▶ 2013 à 2015 - **Baccalauréat Série scientifique** (Mention très bien)  
Lycée Jean Macé - Niort, France

## Compétences techniques et expérimentales

- ▶ **Microfabrication en salle blanche :** Gravure silicium, Photolithographie de résine SU-8.
- ▶ **Microfluidique et instrumentation :** Fabrication de puce en PDMS, automatisation de la mise en flux avec des contrôleurs de pression.
- ▶ **Biologie cellulaire :** Culture de cellules primaires endothéliales (HUVEC, HMVEC-L), fibroblastes (NHLF) et de lignées immortalisées (THP-1, MDA-DB-231, HeLa) in vitro, en configuration 2D ou 3D, monocouche et co-culture.
- ▶ **Biologie Moléculaire et biochimie :** Extraction et dosage ARN, RT-qPCR, immunomarquage.
- ▶ **Microscopie et analyse d'image :** Microscopie électronique à balayage, Imagerie confocale, traitement et analyse quantitative via Fiji-ImageJ, reconstruction 3D.
- ▶ **Conception et simulation :** Catia, Fusion 360, COMSOL Multiphysics
- ▶ **Programmation et langages :** Labview, Matlab, Python, SQL, Java
- ▶ **Bureautique et production visuelles :** Suite Office, Photoshop, Illustrator, Indesign, Premiere Pro

## Certifications

- ▶ 2015 - **Gestion de projet - Certification MOOC GdP6**
- ▶ 2016 - **Anglais - TOEIC 970/990**

## Publications et communications

### Publications scientifiques

**Article** : [E. Delannoy](#), G. Tellier, A. Treizebre & F. Soncin, «Multi-layered human blood vessels-on-chip via double viscous finger patterning», *soumis*.

**Article de conférence** : [E. Delannoy](#), A. Treizebre & F. Soncin, «New microfluidic designs for high-throughput analysis of angiogenesis, blood vessel permeability and endothelial activation», *MicroTAS proceedings*, 845-6, 2020.

### Communications orales

**Congrès de la Société Française d'Angiogenèse (SFA)** - Novembre 2021 : « *Multi-layered human blood vessels-on-chips* ».

**Journées scientifiques du cancerpôle Nord-Ouest** - Octobre 2021 : « *Modèles de vaisseaux sanguins-sur-puce pour l'étude fonctionnelle des cellules endothéliales* ».

**Séminaire invité au C2VN de Marseille** - Septembre 2021 : « *Blood vessels-on-chip model for studying endothelial cell functions* ».

**Séminaire invité institut OncoLille** - Mars 2021 : « *Blood vessels-on-chip model for studying endothelial cell functions* ».

### Posters

**Conférence internationale EUROoCs (visio)** - Juillet 2021 : [E. Delannoy](#), G. Tellier, A. Treizebre & F. Soncin, « *Blood vessels-on-chip model for studying endothelial cell functions* ».

**Conférence internationale MicroTAS (visio)** - Octobre 2020 : [E. Delannoy](#), A. Treizebre & F. Soncin, «New microfluidic designs for high-throughput analysis of angiogenesis, blood vessel permeability and endothelial activation».

## Référents

### Fabrice SONCIN,

Directeur de recherche INSERM, CNRS IRL2820 LIMMS-IIS, Projet SMMiL-E (Lille)

IRCL, Place de Verdun, 59045 Lille Cedex, France, [fabrice.soncin@inserm.fr](mailto:fabrice.soncin@inserm.fr), +33 3 20 29 56 96

### Anthony TREIZEBRE

Maitre de conférence à l'université de Lille, Sciences et Technologies, Institut d'Electronique de Microélectronique et de Nanotechnologie (IEMN) CNRS UMR 8520

Cité Scientifique - Avenue Poincaré - CS 60069, 59652 Villeneuve d'Acscq Cedex, France ,

[anthony.treizebre@univ-lille.fr](mailto:anthony.treizebre@univ-lille.fr), +33 3 20 19 79 37

## Centres d'intérêts

Rugby à XV en compétition - championnat Elite et Fédérale 1

Musculation

Annexe 2 : Article de conférence, E. Delannoy, A. Treizebre & F. Soncin, «New microfluidic designs for high-throughput analysis of angiogenesis, blood vessel permeability and endothelial activation», MicroTAS proceedings, 845-6, 2020.

## NEW MICROFLUIDIC DESIGNS FOR HIGH-THROUGHPUT ANALYSIS OF ANGIOGENESIS, BLOOD VESSEL PERMEABILITY AND ENDOTHELIAL ACTIVATION

Elise Delannoy<sup>\*1,2</sup>, Anthony Treizebre<sup>2</sup>, and Fabrice Soncin<sup>1</sup>

<sup>1</sup>CNRS, UMI2820, LIMMS-IIS, COL, Lille University, SMMiL-E Project, CNRS Délégation Nord-Pas de Calais et Picardie, Lille, France

<sup>2</sup>Univ. Lille, CNRS, Centrale Lille, Yncréa ISEN, Univ. Polytechnique Hauts-de-France, UMR 8520 – IEMN, Lille, France

### ABSTRACT

Angiogenesis is the process by which new blood vessels arise from existing ones. Angiogenesis is involved in human cancers; new blood vessels favor tumor development by bringing oxygen and nutrients to the developing mass. We designed angiogenesis-on-chip devices using a viscosity finger patterning technique for creating established blood vessels in hydrogels on which endothelial integrity and permeability could be assessed, and from which sprouting angiogenesis may be induced. These BioMEMS are designed in multiwell plate format to be used for high throughput drug screening.

**KEYWORDS:** Sprouting Angiogenesis, Blood Vessels, Organ-on-chip, Vascular Permeability

### INTRODUCTION

Established blood vessels are able to produce new vessels through the process of sprouting angiogenesis which favors tumor development, and which is the target of several anti-cancer therapies currently used in clinics. The blood vessel endothelium is also a barrier to the efficient crossing of therapies from the blood circulation into solid tumors. Several assays have been developed to study angiogenesis, but most of them are either not physiologically relevant (2D in-vitro assays), or costly, time consuming, and species-specific (animal models). Microfluidic technologies prove very useful to bridge such gap. Endothelial cell culture inside a PDMS chip allows to assess vessel function in a 3D configuration, under shear-stress perfusion which mimic the blood circulation, and with a precise modulation of the matrix composition and physical properties, while under real-time observation [1].

We create angiogenesis-on-chip devices that combine 3D cell culture approaches, physiological dynamics and sensors within a controlled microenvironment. A first device had been developed as a proof of concept [2][3] and, the current project here presented is to downscale such design for high throughput screening, adapt it to perfusion, and include sensors to improve its complexity and relevance. We successfully created 3D tubular structures within a hydrogel, lined them with human primary endothelial cells which organized themselves into perfusable lumens and which displayed a valid endothelium integrity and responded to natural permeability stimuli.

### EXPERIMENTAL

The new device, fabricated in silicone elastomer (PDMS), is composed of 8 independent rectangular channels of 9mm length, 300µm height, and 400µm or 1mm width. The chips are filled with a collagen hydrogel (3mg/mL), in which hollow tubes are formed by the viscous finger patterning (VFP) method (Figure 1), based on [4] with improvements to reduce lumen diameter and to achieve a higher success rate. Interestingly, VFP may be performed twice (Figure 2), the second time using the cell suspension directly.

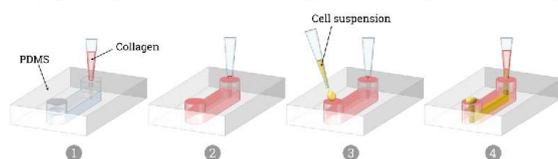


Figure 1: Step-by-step description of the VFP technique used

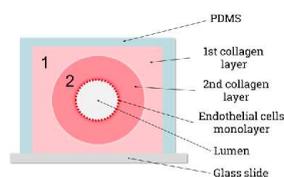


Figure 2: Double VFP transversal-section

The cell suspension ( $40 \cdot 10^6$  cells/mL) contains primary Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC), which form a confluent and cohesive monolayer such as to reproduce the inner face of a blood vessel.

## RESULTS AND DISCUSSION

3D biomimetic blood vessels were successfully generated in a reproducible manner. The vessels are surrounded by a layer of collagen I, ranging from 100-150 $\mu\text{m}$  (400 $\mu\text{m}$  chips) to 300-400 $\mu\text{m}$  (1mm chips), which is thick enough to observe angiogenic events sprouting from the established vessel and endothelial cells migrating within the hydrogel layer. The vessels were kept in culture for a week, the medium being replaced every other day. Cells were fixed and immunostained for confocal imaging (Figure 3).

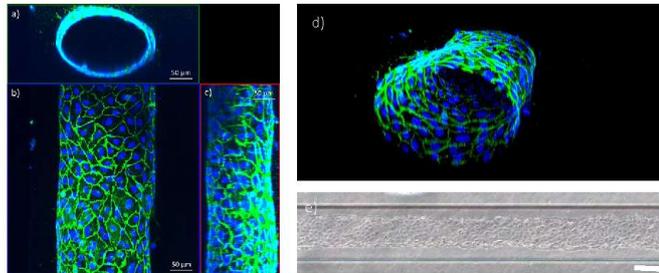


Figure 3: Confocal imaging of the engineered vessel. Immunostaining of the nucleus in blue (DAPI) and of the cellular junction in green (VE-cadherin). Maximum intensity projection of a) the Y axis b) Z axis c) X axis. d) 3D reconstruction. e) Phase contrast image of the created vessel 72h post cells seeding, bar: 200 $\mu\text{m}$

Endothelial junction integrity was assessed by VE-cadherin and actin immunofluorescence & confocal microscopy, and the cell response to inflammatory cytokines were validated by RT-qPCR. The vessel permeability was assessed by measuring the diffusivity of a dextran solution injected inside the lumen (Figure 4).

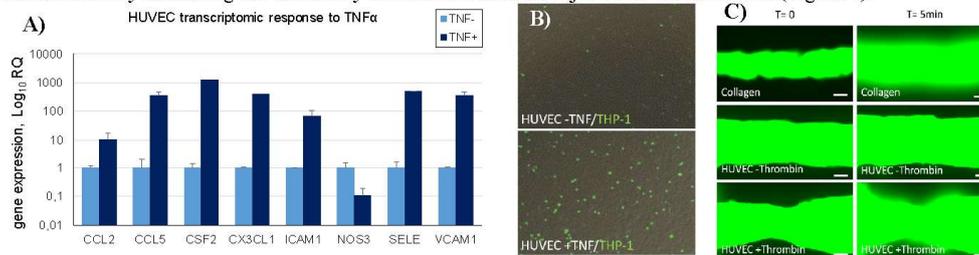


Figure 4: A) Expression of inflammatory genes in HUVEC stimulated with 10 ng/ml TNF $\alpha$  for 6h analyzed using Taqman array cards and a Quantstudio 7 Flex qPCR B) Adhesion of immune cells (calcein-AM, green) on a monolayer of HUVEC stimulated or not with TNF- $\alpha$  (phase contrast) C) Permeability assay using 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$  FITC-dextran (green) on initial bare lumens (collagen) or cell-lined vessels (HUVEC) stimulated or not with 25U/mL thrombin for 1h. bar : 200 $\mu\text{m}$

## PERPECTIVES

The present devices offer the possibility to reproduce an initial blood vessel from which angiogenesis may be induced. Furthermore, they are designed in multiwell plate format in order to be compatible with automated robotic platforms and to perform drug screening. The initial vessel response to pro-inflammatory cytokines will be further validated by its ability to allow the arrest of immune cells. The next steps are to perfuse the devices under controlled flow and shear stress conditions and to be able to visualize the angiogenic process using real-time video microscopy.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work is in the framework of SMMiL-E activities. The authors acknowledge the French State-Region plan (CPER IRICL, Lille Interdisciplinary research Institute against cancer) for financial support and IRCL for hosting SMMiL-E. They also thank Région Hauts-de-France, Fondation I-SITE ULNE, and HCS Pharma for participating in ED PhD financial support.

## REFERENCES

- [1] Nowak-Sliwinska et al. *Angiogenesis* 21, (2018)
- [2] Pauty, J. et al. *EBioMedicine* 27, (2018).
- [3] Usuba, R. et al. *Biomaterials* 197, (2019).
- [4] Bischel L. et al., *Journal of Laboratory Automation* 17, 96–103 (2012).

## CONTACT

\*E. Delannoy, [elise.delannoy@univ-lille.fr](mailto:elise.delannoy@univ-lille.fr)

# Références

- [1] T. Ramos et L. Moroni, « Tissue Engineering and Regenerative Medicine 2019: The Role of Biofabrication—A Year in Review », *Tissue Eng. Part C Methods*, vol. 26, n° 2, p. 91-106, févr. 2020, doi: 10.1089/ten.tec.2019.0344.
- [2] G. M. Whitesides, « The origins and the future of microfluidics », *Nature*, vol. 442, n° 7101, p. 368-373, juill. 2006, doi: 10.1038/nature05058.
- [3] D. Figeys et D. Pinto, « Lab-on-a-Chip: A Revolution in Biological and Medical Sciences. », *Anal. Chem.*, vol. 72, n° 9, p. 330 A-335 A, mai 2000, doi: 10.1021/ac002800y.
- [4] J.-S. Kwon et J. H. Oh, « Microfluidic Technology for Cell Manipulation », *Appl. Sci.*, vol. 8, n° 6, Art. n° 6, juin 2018, doi: 10.3390/app8060992.
- [5] D. Huh, B. D. Matthews, A. Mammoto, M. Montoya-Zavala, H. Y. Hsin, et D. E. Ingber, « Reconstituting Organ-Level Lung Functions on a Chip », *Science*, vol. 328, n° 5986, p. 1662-1668, juin 2010, doi: 10.1126/science.1188302.
- [6] K. Duval *et al.*, « Modeling Physiological Events in 2D vs. 3D Cell Culture », *Physiology*, vol. 32, n° 4, p. 266-277, juill. 2017, doi: 10.1152/physiol.00036.2016.
- [7] B. M. Baker et C. S. Chen, « Deconstructing the third dimension – how 3D culture microenvironments alter cellular cues », *J. Cell Sci.*, p. jcs.079509, janv. 2012, doi: 10.1242/jcs.079509.
- [8] K. Chitcholtan, E. Asselin, S. Parent, P. H. Sykes, et J. J. Evans, « Differences in growth properties of endometrial cancer in three dimensional (3D) culture and 2D cell monolayer », *Exp. Cell Res.*, vol. 319, n° 1, p. 75-87, janv. 2013, doi: 10.1016/j.yexcr.2012.09.012.
- [9] F. Bonnier *et al.*, « Cell viability assessment using the Alamar blue assay: A comparison of 2D and 3D cell culture models », *Toxicol. In Vitro*, vol. 29, n° 1, p. 124-131, févr. 2015, doi: 10.1016/j.tiv.2014.09.014.
- [10] J. W. Scannell, A. Blanckley, H. Boldon, et B. Warrington, « Diagnosing the decline in pharmaceutical R&D efficiency », *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 11, n° 3, p. 191-200, mars 2012, doi: 10.1038/nrd3681.
- [11] B. Zhang et M. Radisic, « Organ-on-a-chip devices advance to market », *Lab. Chip*, vol. 17, n° 14, p. 2395-2420, 2017, doi: 10.1039/C6LC01554A.
- [12] I. W. Mak, N. Evaniew, et M. Ghert, « Lost in translation: animal models and clinical trials in cancer treatment », *Am. J. Transl. Res.*, vol. 6, n° 2, p. 114-118, janv. 2014.
- [13] L. A. Low, C. Mummery, B. R. Berridge, C. P. Austin, et D. A. Tagle, « Organs-on-chips: into the next decade », *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 20, n° 5, p. 345-361, mai 2021, doi: 10.1038/s41573-020-0079-3.
- [14] R. Singhvi *et al.*, « Engineering cell shape and function », *Science*, vol. 264, n° 5159, p. 696-698, avr. 1994, doi: 10.1126/science.8171320.
- [15] H. Becker, « Polymer microfluidic devices », *Talanta*, vol. 56, n° 2, p. 267-287, févr. 2002, doi: 10.1016/S0039-9140(01)00594-X.
- [16] K. Ren, J. Zhou, et H. Wu, « Materials for Microfluidic Chip Fabrication », *Acc. Chem. Res.*, vol. 46, n° 11, p. 2396-2406, nov. 2013, doi: 10.1021/ar300314s.
- [17] J. Friend et L. Yeo, « Fabrication of microfluidic devices using polydimethylsiloxane », *Biomicrofluidics*, vol. 4, n° 2, p. 026502, juin 2010, doi: 10.1063/1.3259624.
- [18] H. Hillborg, J. F. Ankner, U. W. Gedde, G. D. Smith, H. K. Yasuda, et K. Wikström, « Crosslinked polydimethylsiloxane exposed to oxygen plasma studied by neutron reflectometry and other

- surface specific techniques », *Polymer*, vol. 41, n° 18, p. 6851-6863, août 2000, doi: 10.1016/S0032-3861(00)00039-2.
- [19] E. Berthier, E. W. K. Young, et D. Beebe, « Engineers are from PDMS-land, Biologists are from Polystyrenia », *Lab. Chip*, vol. 12, n° 7, p. 1224, 2012, doi: 10.1039/c2lc20982a.
- [20] S. N. Bhatia et D. E. Ingber, « Microfluidic organs-on-chips », *Nat. Biotechnol.*, vol. 32, n° 8, p. 760-772, août 2014, doi: 10.1038/nbt.2989.
- [21] C.-W. Tsao, « Polymer Microfluidics: Simple, Low-Cost Fabrication Process Bridging Academic Lab Research to Commercialized Production », *Micromachines*, vol. 7, n° 12, Art. n° 12, déc. 2016, doi: 10.3390/mi7120225.
- [22] M. M. Stanton, J. M. Rankenberg, B.-W. Park, W. G. McGimpsey, C. Malcuit, et C. R. Lambert, « Cell Behavior on Surface Modified Polydimethylsiloxane (PDMS) », *Macromol. Biosci.*, vol. 14, n° 7, p. 953-964, 2014, doi: 10.1002/mabi.201300504.
- [23] S. Ahadian *et al.*, « Organ-On-A-Chip Platforms: A Convergence of Advanced Materials, Cells, and Microscale Technologies », *Adv. Healthc. Mater.*, vol. 7, n° 2, p. 1700506, 2018, doi: 10.1002/adhm.201700506.
- [24] L. A. Osório, E. Silva, et R. E. Mackay, « A Review of Biomaterials and Scaffold Fabrication for Organ-on-a-Chip (OOAC) Systems », *Bioengineering*, vol. 8, n° 8, p. 113, août 2021, doi: 10.3390/bioengineering8080113.
- [25] E. A. Aisenbrey et W. L. Murphy, « Synthetic alternatives to Matrigel », *Nat. Rev. Mater.*, vol. 5, n° 7, p. 539-551, juill. 2020, doi: 10.1038/s41578-020-0199-8.
- [26] A. P. Wong, R. Perez-Castillejos, J. Christopher Love, et G. M. Whitesides, « Partitioning microfluidic channels with hydrogel to construct tunable 3-D cellular microenvironments », *Biomaterials*, vol. 29, n° 12, p. 1853-1861, avr. 2008, doi: 10.1016/j.biomaterials.2007.12.044.
- [27] K. Gelse, E. Pöschl, et T. Aigner, « Collagens—structure, function, and biosynthesis », *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 55, n° 12, p. 1531-1546, nov. 2003, doi: 10.1016/j.addr.2003.08.002.
- [28] Y. Xiao *et al.*, « Microfabricated perfusable cardiac biowire: a platform that mimics native cardiac bundle », *Lab Chip*, vol. 14, n° 5, p. 869-882, 2014, doi: 10.1039/C3LC51123E.
- [29] L. A. Verneti *et al.*, « A human liver microphysiology platform for investigating physiology, drug safety, and disease models », *Exp. Biol. Med.*, vol. 241, n° 1, p. 101-114, janv. 2016, doi: 10.1177/1535370215592121.
- [30] J. Pauty *et al.*, « A Vascular Endothelial Growth Factor-Dependent Sprouting Angiogenesis Assay Based on an In Vitro Human Blood Vessel Model for the Study of Anti-Angiogenic Drugs », *EBioMedicine*, vol. 27, p. 225-236, janv. 2018, doi: 10.1016/j.ebiom.2017.12.014.
- [31] H.-C. Huang, Y.-J. Chang, W.-C. Chen, H. I.-C. Harn, M.-J. Tang, et C.-C. Wu, « Enhancement of Renal Epithelial Cell Functions through Microfluidic-Based Coculture with Adipose-Derived Stem Cells », *Tissue Eng. Part A*, vol. 19, n° 17-18, p. 2024-2034, sept. 2013, doi: 10.1089/ten.tea.2012.0605.
- [32] A. Herland, A. D. van der Meer, E. A. FitzGerald, T.-E. Park, J. J. F. Sleebom, et D. E. Ingber, « Distinct Contributions of Astrocytes and Pericytes to Neuroinflammation Identified in a 3D Human Blood-Brain Barrier on a Chip », *PLoS One*, vol. 11, n° 3, p. e0150360, 2016, doi: 10.1371/journal.pone.0150360.
- [33] K. Yue, G. Trujillo-de Santiago, M. M. Alvarez, A. Tamayol, N. Annabi, et A. Khademhosseini, « Synthesis, properties, and biomedical applications of gelatin methacryloyl (GelMA) hydrogels », *Biomaterials*, vol. 73, p. 254-271, déc. 2015, doi: 10.1016/j.biomaterials.2015.08.045.
- [34] Y. Xu et X. Wang, « Fluid and cell behaviors along a 3D printed alginate/gelatin/fibrin channel », *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 112, n° 8, p. 1683-1695, 2015, doi: 10.1002/bit.25579.
- [35] M. Verhulsel, M. Vignes, S. Descroix, L. Malaquin, D. M. Vignjevic, et J.-L. Viovy, « A review of microfabrication and hydrogel engineering for micro-organs on chips », *Biomaterials*, vol. 35, n° 6, p. 1816-1832, févr. 2014, doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.11.021.
- [36] W. A. Farahat *et al.*, « Ensemble analysis of angiogenic growth in three-dimensional microfluidic cell cultures », *PLoS One*, vol. 7, n° 5, p. e37333, 2012, doi: 10.1371/journal.pone.0037333.

- [37] S. E. Park, J. Ahn, H.-E. Jeong, I. Youn, D. Huh, et S. Chung, « A three-dimensional in vitro model of the peripheral nervous system », *NPG Asia Mater.*, vol. 13, n° 1, p. 2, déc. 2021, doi: 10.1038/s41427-020-00273-w.
- [38] S. Chung, R. Sudo, P. J. Mack, C.-R. Wan, V. Vickerman, et R. D. Kamm, « Cell migration into scaffolds under co-culture conditions in a microfluidic platform », *Lab Chip*, vol. 9, n° 2, p. 269-275, 2009, doi: 10.1039/B807585A.
- [39] O. Sarig-Nadir, N. Livnat, R. Zajdman, S. Shoham, et D. Seliktar, « Laser Photoablation of Guidance Microchannels into Hydrogels Directs Cell Growth in Three Dimensions », *Biophys. J.*, vol. 96, n° 11, p. 4743-4752, juin 2009, doi: 10.1016/j.bpj.2009.03.019.
- [40] N. Brandenberg et M. P. Lutolf, « In Situ Patterning of Microfluidic Networks in 3D Cell-Laden Hydrogels », *Adv. Mater.*, vol. 28, n° 34, p. 7450-7456, 2016, doi: 10.1002/adma.201601099.
- [41] E. Mazari-Arrighi *et al.*, « Construction of functional biliary epithelial branched networks with predefined geometry using digital light stereolithography », p. 20.
- [42] V. Beachley et X. Wen, « Effect of electrospinning parameters on the nanofiber diameter and length », *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.*, vol. 29, n° 3, p. 663-668, avr. 2009, doi: 10.1016/j.msec.2008.10.037.
- [43] X. Yang *et al.*, « Nanofiber membrane supported lung-on-a-chip microdevice for anti-cancer drug testing », *Lab. Chip*, vol. 18, n° 3, p. 486-495, 2018, doi: 10.1039/C7LC01224A.
- [44] T. J. Sill et H. A. von Recum, « Electrospinning: Applications in drug delivery and tissue engineering », *Biomaterials*, vol. 29, n° 13, p. 1989-2006, mai 2008, doi: 10.1016/j.biomaterials.2008.01.011.
- [45] L. E. Bertassoni *et al.*, « Hydrogel bioprinted microchannel networks for vascularization of tissue engineering constructs », *Lab Chip*, vol. 14, n° 13, p. 2202-2211, 2014, doi: 10.1039/C4LC00030G.
- [46] J. U. Lind *et al.*, « Instrumented cardiac microphysiological devices via multimaterial three-dimensional printing », *Nat. Mater.*, vol. 16, n° 3, p. 303-308, mars 2017, doi: 10.1038/nmat4782.
- [47] X. Ma *et al.*, « Deterministically patterned biomimetic human iPSC-derived hepatic model via rapid 3D bioprinting », *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 113, n° 8, p. 2206-2211, févr. 2016, doi: 10.1073/pnas.1524510113.
- [48] H. Onoe *et al.*, « Metre-long cell-laden microfibres exhibit tissue morphologies and functions », *Nat. Mater.*, vol. 12, n° 6, p. 584-590, juin 2013, doi: 10.1038/nmat3606.
- [49] V. Chan, P. Zorlutuna, J. H. Jeong, H. Kong, et R. Bashir, « Three-dimensional photopatterning of hydrogels using stereolithography for long-term cell encapsulation », *Lab. Chip*, vol. 10, n° 16, p. 2062, 2010, doi: 10.1039/c004285d.
- [50] A. Torsvik *et al.*, « U-251 revisited: genetic drift and phenotypic consequences of long-term cultures of glioblastoma cells », *Cancer Med.*, vol. 3, n° 4, p. 812-824, 2014, doi: 10.1002/cam4.219.
- [51] G. Stacey, « Primary Cell Cultures and Immortal Cell Lines », in *eLS*, American Cancer Society, 2006. doi: 10.1038/npg.els.0003960.
- [52] C. Pan, C. Kumar, S. Bohl, U. Klingmueller, et M. Mann, « Comparative Proteomic Phenotyping of Cell Lines and Primary Cells to Assess Preservation of Cell Type-specific Functions », *Mol. Cell. Proteomics MCP*, vol. 8, n° 3, p. 443-450, mars 2009, doi: 10.1074/mcp.M800258-MCP200.
- [53] H. Stoll, H. Kiessling, et M. Stelzle, « Microfluidic chip system for the selection and enrichment of cell binding aptamers », p. 12, 2015.
- [54] V. N. Goral, Y.-C. Hsieh, O. N. Petzold, J. S. Clark, P. K. Yuen, et R. A. Faris, « Perfusion-based microfluidic device for three-dimensional dynamic primary human hepatocyte cell culture in the absence of biological or synthetic matrices or coagulants », *Lab. Chip*, vol. 10, n° 24, p. 3380, 2010, doi: 10.1039/c0lc00135j.
- [55] P. J. Lee, P. J. Hung, et L. P. Lee, « An artificial liver sinusoid with a microfluidic endothelial-like barrier for primary hepatocyte culture », *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 97, n° 5, p. 1340-1346, 2007, doi: 10.1002/bit.21360.
- [56] K. Schimek *et al.*, « Integrating biological vasculature into a multi-organ-chip microsystem », *Lab. Chip*, vol. 13, n° 18, p. 3588, 2013, doi: 10.1039/c3lc50217a.

- [57] A. Shimizu, W. H. Goh, S. Itai, M. Hashimoto, S. Miura, et H. Onoe, « ECM-based microchannel for culturing *in vitro* vascular tissues with simultaneous perfusion and stretch », *Lab. Chip*, vol. 20, n° 11, p. 1917-1927, 2020, doi: 10.1039/D0LC00254B.
- [58] S. Itai, H. Tajima, et H. Onoe, « Double-layer perfusable collagen microtube device for heterogeneous cell culture », *Biofabrication*, vol. 11, n° 1, p. 015010, nov. 2018, doi: 10.1088/1758-5090/aaf09b.
- [59] N. J. Douville *et al.*, « Combination of fluid and solid mechanical stresses contribute to cell death and detachment in a microfluidic alveolar model », *Lab Chip*, vol. 11, n° 4, p. 609-619, 2011, doi: 10.1039/C0LC00251H.
- [60] H. Tavana, P. Zamankhan, P. J. Christensen, J. B. Grotberg, et S. Takayama, « Epithelium damage and protection during reopening of occluded airways in a physiologic microfluidic pulmonary airway model », *Biomed. Microdevices*, vol. 13, n° 4, p. 731-742, août 2011, doi: 10.1007/s10544-011-9543-5.
- [61] K. H. Benam *et al.*, « Small airway-on-a-chip enables analysis of human lung inflammation and drug responses *in vitro* », *Nat. Methods*, vol. 13, n° 2, p. 151-157, févr. 2016, doi: 10.1038/nmeth.3697.
- [62] L. Cucullo, N. Marchi, M. Hossain, et D. Janigro, « A dynamic *in vitro* BBB model for the study of immune cell trafficking into the central nervous system », *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, vol. 31, n° 2, p. 767-777, févr. 2011, doi: 10.1038/jcbfm.2010.162.
- [63] J. A. Brown *et al.*, « Recreating blood-brain barrier physiology and structure on chip: A novel neurovascular microfluidic bioreactor », *Biomicrofluidics*, vol. 9, n° 5, p. 054124, oct. 2015, doi: 10.1063/1.4934713.
- [64] K.-J. Jang *et al.*, « Human kidney proximal tubule-on-a-chip for drug transport and nephrotoxicity assessment », *Integr. Biol.*, vol. 5, n° 9, p. 1119-1129, sept. 2013, doi: 10.1039/c3ib40049b.
- [65] G. Ligresti *et al.*, « A Novel Three-Dimensional Human Peritubular Microvascular System », *J. Am. Soc. Nephrol. JASN*, vol. 27, n° 8, p. 2370, août 2016, doi: 10.1681/ASN.2015070747.
- [66] S. Chang *et al.*, « Phenotypic Modulation of Primary Vascular Smooth Muscle Cells by Short-Term Culture on Micropatterned Substrate », *PLOS ONE*, vol. 9, n° 2, p. e88089, févr. 2014, doi: 10.1371/journal.pone.0088089.
- [67] J. Xu, Y. Du, et H. Deng, « Direct Lineage Reprogramming: Strategies, Mechanisms, and Applications », *Cell Stem Cell*, vol. 16, n° 2, p. 119-134, févr. 2015, doi: 10.1016/j.stem.2015.01.013.
- [68] A. Mathur *et al.*, « Human iPSC-based Cardiac Microphysiological System For Drug Screening Applications », *Sci. Rep.*, vol. 5, n° 1, p. 8883, août 2015, doi: 10.1038/srep08883.
- [69] C. Du, K. Narayanan, M. F. Leong, et A. C. A. Wan, « Induced pluripotent stem cell-derived hepatocytes and endothelial cells in multi-component hydrogel fibers for liver tissue engineering », *Biomaterials*, vol. 35, n° 23, p. 6006-6014, juill. 2014, doi: 10.1016/j.biomaterials.2014.04.011.
- [70] Y. I. Wang, H. E. Abaci, et M. L. Shuler, « Microfluidic blood-brain barrier model provides *in vivo*-like barrier properties for drug permeability screening », *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 114, n° 1, p. 184-194, 2017, doi: 10.1002/bit.26045.
- [71] A. van den Berg, C. L. Mummery, R. Passier, et A. D. van der Meer, « Personalised organs-on-chips: functional testing for precision medicine », *Lab. Chip*, vol. 19, n° 2, p. 198-205, 2019, doi: 10.1039/C8LC00827B.
- [72] S. M. Hattersley, C. E. Dyer, J. Greenman, et S. J. Haswell, « Development of a microfluidic device for the maintenance and interrogation of viable tissue biopsies », *Lab. Chip*, vol. 8, n° 11, p. 1842, 2008, doi: 10.1039/b809345h.
- [73] R. Kennedy *et al.*, « A patient tumour-on-a-chip system for personalised investigation of radiotherapy based treatment regimens », *Sci. Rep.*, vol. 9, n° 1, p. 6327, déc. 2019, doi: 10.1038/s41598-019-42745-2.
- [74] K. K. Parker et D. E. Ingber, « Extracellular matrix, mechanotransduction and structural hierarchies in heart tissue engineering », *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.*, juin 2007, doi: 10.1098/rstb.2007.2114.

- [75] D. T. T. Phan *et al.*, « A vascularized and perfused organ-on-a-chip platform for large-scale drug screening applications », *Lab. Chip*, vol. 17, n° 3, p. 511-520, 31 2017, doi: 10.1039/c6lc01422d.
- [76] E. K. U. Larsen, M. B. L. Mikkelsen, et N. B. Larsen, « Protein and cell patterning in closed polymer channels by photoimmobilizing proteins on photografted poly(ethylene glycol) diacrylate », *Biomicrofluidics*, vol. 8, n° 6, p. 064127, nov. 2014, doi: 10.1063/1.4905093.
- [77] R. J. Wade, E. J. Bassin, W. M. Gramlich, et J. A. Burdick, « Nanofibrous Hydrogels with Spatially Patterned Biochemical Signals to Control Cell Behavior », *Adv. Mater.*, vol. 27, n° 8, p. 1356-1362, 2015, doi: 10.1002/adma.201404993.
- [78] J. A. Whisler, M. B. Chen, et R. D. Kamm, « Control of perfusable microvascular network morphology using a multiculture microfluidic system », *Tissue Eng. Part C Methods*, vol. 20, n° 7, p. 543-552, juill. 2014, doi: 10.1089/ten.TEC.2013.0370.
- [79] R. Booth et H. Kim, « Characterization of a microfluidic in vitro model of the blood-brain barrier ( $\mu$ BBB) », *Lab. Chip*, vol. 12, n° 10, p. 1784, 2012, doi: 10.1039/c2lc40094d.
- [80] Y. Zheng *et al.*, « In vitro microvessels for the study of angiogenesis and thrombosis », *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 109, n° 24, p. 9342-9347, juin 2012, doi: 10.1073/pnas.1201240109.
- [81] X. Li, S. M. George, L. Verneti, A. H. Gough, et D. L. Taylor, « A glass-based, continuously zoned and vascularized human liver acinus microphysiological system (vLAMPS) designed for experimental modeling of diseases and ADME/TOX », *Lab. Chip*, vol. 18, n° 17, p. 2614-2631, 2018, doi: 10.1039/C8LC00418H.
- [82] C. Franco et H. Gerhardt, « Blood vessels on a chip », *Nature*, vol. 488, n° 7412, p. 465-466, août 2012, doi: 10.1038/488465a.
- [83] A. Carraro *et al.*, « In vitro analysis of a hepatic device with intrinsic microvascular-based channels », *Biomed. Microdevices*, vol. 10, n° 6, p. 795-805, déc. 2008, doi: 10.1007/s10544-008-9194-3.
- [84] J. Theobald *et al.*, « Liver-Kidney-on-Chip To Study Toxicity of Drug Metabolites », *ACS Biomater. Sci. Eng.*, vol. 4, n° 1, p. 78-89, janv. 2018, doi: 10.1021/acsbomaterials.7b00417.
- [85] D. Huh *et al.*, « Acoustically detectable cellular-level lung injury induced by fluid mechanical stresses in microfluidic airway systems », *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 104, n° 48, p. 18886-18891, nov. 2007, doi: 10.1073/pnas.0610868104.
- [86] L. C. Delon *et al.*, « A systematic investigation of the effect of the fluid shear stress on Caco-2 cells towards the optimization of epithelial organ-on-chip models », *Biomaterials*, vol. 225, p. 119521, déc. 2019, doi: 10.1016/j.biomaterials.2019.119521.
- [87] S. H. Yang *et al.*, « Roles of fluid shear stress and retinoic acid in the differentiation of primary cultured human podocytes », *Exp. Cell Res.*, vol. 354, n° 1, p. 48-56, mai 2017, doi: 10.1016/j.yexcr.2017.03.026.
- [88] J. P. Brody, P. Yager, R. E. Goldstein, et R. H. Austin, « Biotechnology at low Reynolds numbers », *Biophys. J.*, vol. 71, n° 6, p. 3430-3441, déc. 1996, doi: 10.1016/S0006-3495(96)79538-3.
- [89] N. Li Jeon, H. Baskaran, S. K. W. Dertinger, G. M. Whitesides, L. Van De Water, et M. Toner, « Neutrophil chemotaxis in linear and complex gradients of interleukin-8 formed in a microfabricated device », *Nat. Biotechnol.*, vol. 20, n° 8, p. 826-830, août 2002, doi: 10.1038/nbt712.
- [90] H. V. Prentice-Mott, C.-H. Chang, L. Mahadevan, T. J. Mitchison, D. Irimia, et J. V. Shah, « Biased migration of confined neutrophil-like cells in asymmetric hydraulic environments », *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 110, n° 52, p. 21006-21011, déc. 2013, doi: 10.1073/pnas.1317441110.
- [91] S. Han *et al.*, « A versatile assay for monitoring in vivo-like transendothelial migration of neutrophils », *Lab. Chip*, vol. 12, n° 20, p. 3861, 2012, doi: 10.1039/c2lc40445a.
- [92] D.-H. T. Nguyen *et al.*, « Biomimetic model to reconstitute angiogenic sprouting morphogenesis in vitro », *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 110, n° 17, p. 6712-6717, avr. 2013, doi: 10.1073/pnas.1221526110.
- [93] L. L. Bischel, E. W. K. Young, B. R. Mader, et D. J. Beebe, « Tubeless microfluidic angiogenesis assay with three-dimensional endothelial-lined microvessels », *Biomaterials*, vol. 34, n° 5, p. 1471-1477, févr. 2013, doi: 10.1016/j.biomaterials.2012.11.005.

- [94] R.-R. Xiao *et al.*, « Simultaneous Generation of Gradients with Gradually Changed Slope in a Microfluidic Device for Quantifying Axon Response », *Anal. Chem.*, vol. 85, n° 16, p. 7842-7850, août 2013, doi: 10.1021/ac4022055.
- [95] I. L. S. Chua, H.-W. Kim, et J. H. Lee, « Signaling of extracellular matrices for tissue regeneration and therapeutics », *Tissue Eng. Regen. Med.*, vol. 13, n° 1, p. 1-12, févr. 2016, doi: 10.1007/s13770-016-9075-0.
- [96] A. Marsano *et al.*, « Beating heart on a chip: a novel microfluidic platform to generate functional 3D cardiac microtissues », *Lab. Chip*, vol. 16, n° 3, p. 599-610, 2016, doi: 10.1039/C5LC01356A.
- [97] W. L. Stoppel, D. L. Kaplan, et L. D. Black, « Electrical and mechanical stimulation of cardiac cells and tissue constructs », *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 96, p. 135-155, janv. 2016, doi: 10.1016/j.addr.2015.07.009.
- [98] S. S. Nunes *et al.*, « Biowire: a platform for maturation of human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes », *Nat. Methods*, vol. 10, n° 8, p. 781-787, août 2013, doi: 10.1038/nmeth.2524.
- [99] L. Rowe *et al.*, « Active 3-D micro scaffold system with fluid perfusion for culturing in vitro neuronal networks », *Lab. Chip*, vol. 7, n° 4, p. 475, 2007, doi: 10.1039/b700795g.
- [100] Z. Lin, T. Cherng-Wen, P. Roy, et D. Trau, « In-situ measurement of cellular microenvironments in a microfluidic device », *Lab Chip*, vol. 9, n° 2, p. 257-262, 2009, doi: 10.1039/B806907G.
- [101] Y. S. Zhang *et al.*, « Multisensor-integrated organs-on-chips platform for automated and continual in situ monitoring of organoid behaviors », *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 114, n° 12, p. E2293-E2302, mars 2017, doi: 10.1073/pnas.1612906114.
- [102] R. Feiner *et al.*, « Engineered hybrid cardiac patches with multifunctional electronics for online monitoring and regulation of tissue function », *Nat. Mater.*, vol. 15, n° 6, p. 679-685, juin 2016, doi: 10.1038/nmat4590.
- [103] O. Y. F. Henry, R. Villenave, M. J. Cronce, W. D. Leineweber, M. A. Benz, et D. E. Ingber, « Organs-on-chips with integrated electrodes for trans-epithelial electrical resistance (TEER) measurements of human epithelial barrier function », *Lab. Chip*, vol. 17, n° 13, p. 2264-2271, 2017, doi: 10.1039/C7LC00155J.
- [104] A. O. Stucki *et al.*, « A lung-on-a-chip array with an integrated bio-inspired respiration mechanism », *Lab. Chip*, vol. 15, n° 5, p. 1302-1310, 2015, doi: 10.1039/C4LC01252F.
- [105] S. Musah *et al.*, « Mature induced-pluripotent-stem-cell-derived human podocytes reconstitute kidney glomerular-capillary-wall function on a chip », *Nat. Biomed. Eng.*, vol. 1, n° 5, p. 0069, mai 2017, doi: 10.1038/s41551-017-0069.
- [106] L. Ren *et al.*, « Investigation of Hypoxia-Induced Myocardial Injury Dynamics in a Tissue Interface Mimicking Microfluidic Device », *Anal. Chem.*, vol. 85, n° 1, p. 235-244, janv. 2013, doi: 10.1021/ac3025812.
- [107] H. J. Kim, H. Li, J. J. Collins, et D. E. Ingber, « Contributions of microbiome and mechanical deformation to intestinal bacterial overgrowth and inflammation in a human gut-on-a-chip », *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 113, n° 1, p. E7-E15, janv. 2016, doi: 10.1073/pnas.1522193112.
- [108] M. Wufuer *et al.*, « Skin-on-a-chip model simulating inflammation, edema and drug-based treatment », *Sci. Rep.*, vol. 6, n° 1, p. 37471, déc. 2016, doi: 10.1038/srep37471.
- [109] S.-Y. Chang *et al.*, « Human liver-kidney model elucidates the mechanisms of aristolochic acid nephrotoxicity », *JCI Insight*, vol. 2, n° 22, p. e95978, nov. 2017, doi: 10.1172/jci.insight.95978.
- [110] C. Zhang, Z. Zhao, N. A. Abdul Rahim, D. van Noort, et H. Yu, « Towards a human-on-chip: Culturing multiple cell types on a chip with compartmentalized microenvironments », *Lab. Chip*, vol. 9, n° 22, p. 3185, 2009, doi: 10.1039/b915147h.
- [111] E.-M. Materne *et al.*, « The Multi-organ Chip - A Microfluidic Platform for Long-term Multi-tissue Coculture », *J. Vis. Exp.*, n° 98, p. 52526, avr. 2015, doi: 10.3791/52526.
- [112] I. Maschmeyer *et al.*, « A four-organ-chip for interconnected long-term co-culture of human intestine, liver, skin and kidney equivalents », *Lab. Chip*, vol. 15, n° 12, p. 2688-2699, 2015, doi: 10.1039/C5LC00392J.

- [113] N. Tsamandouras, W. L. K. Chen, C. D. Edington, C. L. Stokes, L. G. Griffith, et M. Cirit, « Integrated Gut and Liver Microphysiological Systems for Quantitative In Vitro Pharmacokinetic Studies », *AAPS J.*, vol. 19, n° 5, p. 1499-1512, sept. 2017, doi: 10.1208/s12248-017-0122-4.
- [114] S. Xiao *et al.*, « A microfluidic culture model of the human reproductive tract and 28-day menstrual cycle », *Nat. Commun.*, vol. 8, n° 1, p. 14584, avr. 2017, doi: 10.1038/ncomms14584.
- [115] K. Ronaldson-Bouchard et G. Vunjak-Novakovic, « Organs-on-a-Chip: A Fast Track for Engineered Human Tissues in Drug Development », *Cell Stem Cell*, vol. 22, n° 3, p. 310-324, mars 2018, doi: 10.1016/j.stem.2018.02.011.
- [116] L. Shintu *et al.*, « Metabolomics-on-a-chip and predictive systems toxicology in microfluidic bioartificial organs », *Anal. Chem.*, vol. 84, n° 4, p. 1840-1848, févr. 2012, doi: 10.1021/ac2011075.
- [117] M. B. Esch, G. J. Mahler, T. Stokol, et M. L. Shuler, « Body-on-a-chip simulation with gastrointestinal tract and liver tissues suggests that ingested nanoparticles have the potential to cause liver injury », *Lab Chip*, vol. 14, n° 16, p. 3081-3092, 2014, doi: 10.1039/C4LC00371C.
- [118] L. Verneti *et al.*, « Functional Coupling of Human Microphysiology Systems: Intestine, Liver, Kidney Proximal Tubule, Blood-Brain Barrier and Skeletal Muscle », *Sci. Rep.*, vol. 7, n° 1, p. 42296, sept. 2017, doi: 10.1038/srep42296.
- [119] J. P. Wikswo *et al.*, « Scaling and systems biology for integrating multiple organs-on-a-chip », *Lab. Chip*, vol. 13, n° 18, p. 3496, 2013, doi: 10.1039/c3lc50243k.
- [120] Y. Shin *et al.*, « Microfluidic assay for simultaneous culture of multiple cell types on surfaces or within hydrogels », *Nat. Protoc.*, vol. 7, n° 7, p. 1247-1259, juin 2012, doi: 10.1038/nprot.2012.051.
- [121] X. Li, S. Xu, P. He, et Y. Liu, « In Vitro Recapitulation of Functional Microvessels for the Study of Endothelial Shear Response, Nitric Oxide and [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> », *PLOS ONE*, vol. 10, n° 5, p. e0126797, mai 2015, doi: 10.1371/journal.pone.0126797.
- [122] M. Raasch *et al.*, « Microfluidically supported biochip design for culture of endothelial cell layers with improved perfusion conditions », *Biofabrication*, vol. 7, n° 1, p. 015013, mars 2015, doi: 10.1088/1758-5090/7/1/015013.
- [123] W. J. Polacheck, M. L. Kutys, J. B. Tefft, et C. S. Chen, « Microfabricated blood vessels for modeling the vascular transport barrier », *Nat. Protoc.*, vol. 14, n° 5, p. 1425-1454, mai 2019, doi: 10.1038/s41596-019-0144-8.
- [124] J. S. Miller *et al.*, « Rapid casting of patterned vascular networks for perfusable engineered three-dimensional tissues », *Nat. Mater.*, vol. 11, n° 9, p. 768-774, sept. 2012, doi: 10.1038/nmat3357.
- [125] A. Sobrino *et al.*, « 3D microtumors in vitro supported by perfused vascular networks », *Sci. Rep.*, vol. 6, p. 31589, 23 2016, doi: 10.1038/srep31589.
- [126] L. Wang, Z.-L. Zhang, J. Wdzieczak-Bakala, D.-W. Pang, J. Liu, et Y. Chen, « Patterning cells and shear flow conditions: Convenient observation of endothelial cell remoulding, enhanced production of angiogenesis factors and drug response », *Lab. Chip*, vol. 11, n° 24, p. 4235, 2011, doi: 10.1039/c1lc20722a.
- [127] S. Kim, H. Lee, M. Chung, et N. L. Jeon, « Engineering of functional, perfusable 3D microvascular networks on a chip », *Lab. Chip*, vol. 13, n° 8, p. 1489, 2013, doi: 10.1039/c3lc41320a.
- [128] C. Tung *et al.*, « A contact line pinning based microfluidic platform for modelling physiological flows », *Lab. Chip*, vol. 13, n° 19, p. 3876-3885, août 2013, doi: 10.1039/C3LC50489A.
- [129] A. Tourovskaia, M. Fauver, G. Kramer, S. Simonson, et T. Neumann, « Tissue-engineered microenvironment systems for modeling human vasculature », *Exp. Biol. Med.*, vol. 239, n° 9, p. 1264-1271, sept. 2014, doi: 10.1177/1535370214539228.
- [130] « Multilayered Blood Capillary Analogs in Biodegradable Hydrogels for In Vitro Drug Permeability Assays - Yoshida - 2013 - Advanced Functional Materials - Wiley Online Library », 2013. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/adfm.201201905> (consulté le oct. 11, 2018).
- [131] K. M. Chrobak, D. R. Potter, et J. Tien, « Formation of perfused, functional microvascular tubes in vitro », *Microvasc. Res.*, vol. 71, n° 3, p. 185-196, mai 2006, doi: 10.1016/j.mvr.2006.02.005.

- [132] S. Raghavan, C. M. Nelson, J. D. Baranski, E. Lim, et C. S. Chen, « Geometrically Controlled Endothelial Tubulogenesis in Micropatterned Gels », *Tissue Eng. Part A*, vol. 16, n° 7, p. 2255-2263, juill. 2010, doi: 10.1089/ten.tea.2009.0584.
- [133] Y. Nashimoto *et al.*, « Integrating perfusable vascular networks with a three-dimensional tissue in a microfluidic device », *Integr. Biol.*, vol. 9, n° 6, p. 506-518, juin 2017, doi: 10.1039/c7ib00024c.
- [134] X. Wang, D. T. T. Phan, A. Sobrino, S. C. George, C. C. W. Hughes, et A. P. Lee, « Engineering anastomosis between living capillary networks and endothelial cell-lined microfluidic channels », *Lab. Chip*, vol. 16, n° 2, p. 282-290, 2016, doi: 10.1039/C5LC01050K.
- [135] S. Zhao *et al.*, « Bio-functionalized silk hydrogel microfluidic systems », *Biomaterials*, vol. 93, p. 60-70, juill. 2016, doi: 10.1016/j.biomaterials.2016.03.041.
- [136] C. Norotte, F. S. Marga, L. E. Niklason, et G. Forgacs, « Scaffold-free vascular tissue engineering using bioprinting », *Biomaterials*, vol. 30, n° 30, p. 5910-5917, oct. 2009, doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.06.034.
- [137] A. Dobos *et al.*, « On-chip high-definition bioprinting of microvascular structures », *Biofabrication*, vol. 13, n° 1, p. 015016, janv. 2021, doi: 10.1088/1758-5090/abb063.
- [138] Y. S. Zhang *et al.*, « Bioprinted Thrombosis-on-a-Chip », *Lab. Chip*, vol. 16, n° 21, p. 4097-4105, oct. 2016, doi: 10.1039/c6lc00380j.
- [139] K. A. Heintz, M. E. Bregenzler, J. L. Mantle, K. H. Lee, J. L. West, et J. H. Slater, « Fabrication of 3D Biomimetic Microfluidic Networks in Hydrogels », *Adv. Healthc. Mater.*, vol. 5, n° 17, p. 2153-2160, 2016, doi: 10.1002/adhm.201600351.
- [140] J. C. Culver, J. C. Hoffmann, R. A. Poché, J. H. Slater, J. L. West, et M. E. Dickinson, « Three-Dimensional Biomimetic Patterning in Hydrogels to Guide Cellular Organization », *Adv. Mater.*, vol. 24, n° 17, p. 2344-2348, 2012, doi: 10.1002/adma.201200395.
- [141] H. Bruus, *Theoretical Microfluidics*. 2008.
- [142] O. Français et H. H. Molinaro, « La microfluidique : principes physiques et mise en œuvre d'écoulements continus », p. 10.
- [143] T. M. Geislinger et T. Franke, « Hydrodynamic lift of vesicles and red blood cells in flow — from Fåhræus & Lindqvist to microfluidic cell sorting », *Adv. Colloid Interface Sci.*, vol. 208, p. 161-176, juin 2014, doi: 10.1016/j.cis.2014.03.002.
- [144] S. Takayama *et al.*, « Patterning cells and their environments using multiple laminar fluid flows in capillary networks », *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 96, n° 10, p. 5545-5548, mai 1999, doi: 10.1073/pnas.96.10.5545.
- [145] A. Lashkaripour, C. Rodriguez, L. Ortiz, et D. Densmore, « Performance tuning of microfluidic flow-focusing droplet generators », *Lab. Chip*, vol. 19, n° 6, p. 1041-1053, 2019, doi: 10.1039/C8LC01253A.
- [146] S. L. Anna, N. Bontoux, et H. A. Stone, « Formation of dispersions using “flow focusing” in microchannels », *Appl. Phys. Lett.*, vol. 82, n° 3, p. 364-366, janv. 2003, doi: 10.1063/1.1537519.
- [147] T. Braschler, R. Johann, M. Heule, L. Metref, et P. Renaud, « Gentle cell trapping and release on a microfluidic chip by in situ alginate hydrogel formation », *Lab Chip*, vol. 5, n° 5, p. 553-559, 2005, doi: 10.1039/B417604A.
- [148] M. S. Kim, J. H. Yeon, et J.-K. Park, « A microfluidic platform for 3-dimensional cell culture and cell-based assays », *Biomed. Microdevices*, vol. 9, n° 1, p. 25-34, févr. 2007, doi: 10.1007/s10544-006-9016-4.
- [149] J. Loessberg-Zahl, A. D. van der Meer, A. van den Berg, et J. C. T. Eijkel, « Flow focusing through gels as a tool to generate 3D concentration profiles in hydrogel-filled microfluidic chips », *Lab. Chip*, vol. 19, n° 2, p. 206-213, 2019, doi: 10.1039/C8LC01140K.
- [150] P. G. Saffman et G. I. Taylor, « The penetration of a fluid into a porous medium or Hele-Shaw cell containing a more viscous liquid », *Proc. R. Soc. Lond. Ser. Math. Phys. Sci.*, vol. 245, n° 1242, p. 312-329, juin 1958, doi: 10.1098/rspa.1958.0085.
- [151] Q. K. A, D. Z. A, et S. C. B, « Immiscible displacement in a channel: simulations of fingering in two dimensions ». 2003.

- [152] B. Dong, Y. Y. Yan, W. Li, et Y. Song, « Lattice Boltzmann simulation of viscous fingering phenomenon of immiscible fluids displacement in a channel », *Comput. Fluids*, vol. 39, n° 5, p. 768-779, mai 2010, doi: 10.1016/j.compfluid.2009.12.005.
- [153] Y. Shi et G. H. Tang, « Simulation of Newtonian and non-Newtonian rheology behavior of viscous fingering in channels by the lattice Boltzmann method », *Comput. Math. Appl.*, vol. 68, n° 10, p. 1279-1291, nov. 2014, doi: 10.1016/j.camwa.2014.08.024.
- [154] G. M. Walker et D. J. Beebe, « A passive pumping method for microfluidic devices », *Lab. Chip*, vol. 2, n° 3, p. 131, 2002, doi: 10.1039/b204381e.
- [155] I. Meyvantsson, J. W. Warrick, S. Hayes, A. Skoien, et D. J. Beebe, « Automated cell culture in high density tubeless microfluidic device arrays », *Lab. Chip*, vol. 8, n° 5, p. 717, 2008, doi: 10.1039/b715375a.
- [156] A. D. Castiaux, D. M. Spence, et R. S. Martin, « Review of 3D cell culture with analysis in microfluidic systems », *Anal. Methods*, vol. 11, n° 33, p. 4220-4232, 2019, doi: 10.1039/C9AY01328H.
- [157] M. N. S. de Graaf *et al.*, « Scalable microphysiological system to model three-dimensional blood vessels », *APL Bioeng.*, vol. 3, n° 2, p. 026105, juin 2019, doi: 10.1063/1.5090986.
- [158] L. L. Bischel, S.-H. Lee, et D. J. Beebe, « A Practical Method for Patterning Lumens through ECM Hydrogels via Viscous Finger Patterning », *J. Lab. Autom.*, vol. 17, n° 2, p. 96-103, avr. 2012, doi: 10.1177/2211068211426694.
- [159] P. F. Davies, « Hemodynamic shear stress and the endothelium in cardiovascular pathophysiology », *Nat. Clin. Pract. Cardiovasc. Med.*, vol. 6, n° 1, p. 16-26, janv. 2009, doi: 10.1038/ncpcardio1397.
- [160] B. J. Ballermann, A. Dardik, E. Eng, et A. Liu, « Shear stress and the endothelium », *Kidney Int.*, vol. 54, p. S100-S108, sept. 1998, doi: 10.1046/j.1523-1755.1998.06720.x.
- [161] E. Roux, P. Bougaran, P. Dufourcq, et T. Couffinal, « Fluid Shear Stress Sensing by the Endothelial Layer », *Front. Physiol.*, vol. 11, p. 861, 2020, doi: 10.3389/fphys.2020.00861.
- [162] M. Inglebert *et al.*, « The effect of shear stress reduction on endothelial cells: a microfluidic study of the actin cytoskeleton », *ArXiv200402452 Cond-Mat Physicsphysics Q-Bio*, avr. 2020, Consulté le: oct. 04, 2021. [En ligne]. Disponible sur: <http://arxiv.org/abs/2004.02452>
- [163] R. Sfriso *et al.*, « 3D artificial round section micro-vessels to investigate endothelial cells under physiological flow conditions », *Sci. Rep.*, vol. 8, n° 1, p. 5898, déc. 2018, doi: 10.1038/s41598-018-24273-7.
- [164] C. K. Byun, K. Abi-Samra, Y.-K. Cho, et S. Takayama, « Pumps for microfluidic cell culture », *ELECTROPHORESIS*, vol. 35, n° 2-3, p. 245-257, 2014, doi: 10.1002/elps.201300205.
- [165] B. Furst, *The Heart and Circulation: An Integrative Model*. London: Springer-Verlag, 2014. doi: 10.1007/978-1-4471-5277-4.
- [166] « Révision du système circulatoire (leçon) », *Khan Academy*. <https://fr.khanacademy.org/science/high-school-biology/hs-human-body-systems/hs-the-circulatory-and-respiratory-systems/a/hs-the-circulatory-system-review> (consulté le oct. 14, 2021).
- [167] « Heart & Blood Vessels: Blood Flow », *Cleveland Clinic*. <https://my.clevelandclinic.org/health/articles/17059-how-does-blood-flow-through-your-body> (consulté le oct. 17, 2021).
- [168] R. K. Jain, « Molecular regulation of vessel maturation », *Nat. Med.*, vol. 9, n° 6, p. 685-693, juin 2003, doi: 10.1038/nm0603-685.
- [169] N. Ricard, S. Bailly, C. Guignabert, et M. Simons, « The quiescent endothelium: signalling pathways regulating organ-specific endothelial normalcy », *Nat. Rev. Cardiol.*, vol. 18, n° 8, p. 565-580, août 2021, doi: 10.1038/s41569-021-00517-4.
- [170] O. Cleaver et D. A. Melton, « Endothelial signaling during development », *Nat. Med.*, vol. 9, n° 6, p. 661-668, juin 2003, doi: 10.1038/nm0603-661.

- [171] M. G. Lampugnani, E. Dejana, et C. Giampietro, « Vascular Endothelial (VE)-Cadherin, Endothelial Adherens Junctions, and Vascular Disease », *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 10, n° 10, p. a029322, janv. 2018, doi: 10.1101/cshperspect.a029322.
- [172] L. Caveda *et al.*, « Inhibition of cultured cell growth by vascular endothelial cadherin (cadherin-5/VE-cadherin). », *J. Clin. Invest.*, vol. 98, n° 4, p. 886-893, août 1996, doi: 10.1172/JCI118870.
- [173] E. Dejana, E. Tournier-Lasserre, et B. M. Weinstein, « The Control of Vascular Integrity by Endothelial Cell Junctions: Molecular Basis and Pathological Implications », *Dev. Cell*, vol. 16, n° 2, p. 209-221, févr. 2009, doi: 10.1016/j.devcel.2009.01.004.
- [174] O. Tornavaca *et al.*, « ZO-1 controls endothelial adherens junctions, cell–cell tension, angiogenesis, and barrier formation », *J. Cell Biol.*, vol. 208, n° 6, p. 821-838, mars 2015, doi: 10.1083/jcb.201404140.
- [175] C. Michiels, « Endothelial cell functions », *J. Cell. Physiol.*, vol. 196, n° 3, p. 430-443, 2003, doi: 10.1002/jcp.10333.
- [176] G. Eelen, L. Treps, X. Li, et P. Carmeliet, « Basic and Therapeutic Aspects of Angiogenesis Updated », *Circ. Res.*, vol. 127, n° 2, p. 310-329, juill. 2020, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.120.316851.
- [177] J. S. Pober et W. C. Sessa, « Evolving functions of endothelial cells in inflammation », *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 7, n° 10, p. 803-815, oct. 2007, doi: 10.1038/nri2171.
- [178] H. F. Langer et T. Chavakis, « Leukocyte – endothelial interactions in inflammation », *J. Cell. Mol. Med.*, vol. 13, n° 7, p. 1211-1220, 2009, doi: 10.1111/j.1582-4934.2009.00811.x.
- [179] A. Etzioni, « Adhesion molecules--their role in health and disease », *Pediatr. Res.*, vol. 39, n° 2, p. 191-198, févr. 1996, doi: 10.1203/00006450-199602000-00001.
- [180] W. A. Muller, « Mechanisms of Transendothelial Migration of Leukocytes », *Circ. Res.*, vol. 105, n° 3, p. 223-230, juill. 2009, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.109.200717.
- [181] D. Goswami et D. Vestweber, « How leukocytes trigger opening and sealing of gaps in the endothelial barrier », *F1000Research*, vol. 5, p. F1000 Faculty Rev-2321, sept. 2016, doi: 10.12688/f1000research.9185.1.
- [182] K. Castermans et A. Griffioen, « Tumor blood vessels, a difficult hurdle for infiltrating leukocytes », *Biochim. Biophys. Acta BBA - Rev. Cancer*, vol. 1776, n° 2, p. 160-174, déc. 2007, doi: 10.1016/j.bbcan.2007.07.005.
- [183] D. Vestweber, « How leukocytes cross the vascular endothelium », *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 15, n° 11, p. 692-704, nov. 2015, doi: 10.1038/nri3908.
- [184] F.-R. E. Curry et R. H. Adamson, « Vascular permeability modulation at the cell, microvessel, or whole organ level: towards closing gaps in our knowledge », *Cardiovasc. Res.*, vol. 87, n° 2, p. 218-229, juill. 2010, doi: 10.1093/cvr/cvq115.
- [185] Y. Komarova et A. B. Malik, « Regulation of endothelial permeability via paracellular and transcellular transport pathways », *Annu. Rev. Physiol.*, vol. 72, p. 463-493, 2010, doi: 10.1146/annurev-physiol-021909-135833.
- [186] A. Le Guelte, J. Dwyer, et J. Gavard, « Jumping the barrier: VE-cadherin, VEGF and other angiogenic modifiers in cancer », *Biol. Cell*, vol. 103, n° 12, p. 593-605, 2011, doi: 10.1042/BC20110069.
- [187] R. B. Herberman, M. E. Nunn, H. T. Holden, et D. H. Lavrin, « Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic and allogeneic tumors. II. Characterization of effector cells », *Int. J. Cancer*, vol. 16, n° 2, p. 230-239, 1975, doi: 10.1002/ijc.2910160205.
- [188] P. Shrikant et M. F. Mescher, « Control of Syngeneic Tumor Growth by Activation of CD8+ T Cells: Efficacy Is Limited by Migration Away from the Site and Induction of Nonresponsiveness », *J. Immunol.*, vol. 162, n° 5, p. 2858-2866, mars 1999.
- [189] C. M. Koebel *et al.*, « Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state », *Nature*, vol. 450, n° 7171, p. 903-907, déc. 2007, doi: 10.1038/nature06309.
- [190] D. R. Senger, S. J. Galli, A. M. Dvorak, C. A. Perruzzi, V. S. Harvey, et H. F. Dvorak, « Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid », *Science*, vol. 219, n° 4587, p. 983-985, févr. 1983, doi: 10.1126/science.6823562.

- [191] B. P. Eliceiri, R. Paul, P. L. Schwartzberg, J. D. Hood, J. Leng, et D. A. Cheresh, « Selective requirement for Src kinases during VEGF-induced angiogenesis and vascular permeability », *Mol. Cell*, vol. 4, n° 6, p. 915-924, déc. 1999, doi: 10.1016/s1097-2765(00)80221-x.
- [192] X. L. Chen *et al.*, « VEGF-induced vascular permeability is mediated by FAK », *Dev. Cell*, vol. 22, n° 1, p. 146-157, janv. 2012, doi: 10.1016/j.devcel.2011.11.002.
- [193] S. Esser, M. G. Lampugnani, M. Corada, E. Dejana, et W. Risau, « Vascular endothelial growth factor induces VE-cadherin tyrosine phosphorylation in endothelial cells », *J. Cell Sci.*, vol. 111, n° 13, p. 1853-1865, juill. 1998, doi: 10.1242/jcs.111.13.1853.
- [194] Y. Wallez *et al.*, « Src kinase phosphorylates vascular endothelial-cadherin in response to vascular endothelial growth factor: identification of tyrosine 685 as the unique target site », *Oncogene*, vol. 26, n° 7, p. 1067-1077, févr. 2007, doi: 10.1038/sj.onc.1209855.
- [195] J. Gavard et J. S. Gutkind, « VEGF controls endothelial-cell permeability by promoting the  $\beta$ -arrestin-dependent endocytosis of VE-cadherin », *Nat. Cell Biol.*, vol. 8, n° 11, p. 1223-1234, nov. 2006, doi: 10.1038/ncb1486.
- [196] N. Lambeng *et al.*, « Vascular Endothelial–Cadherin Tyrosine Phosphorylation in Angiogenic and Quiescent Adult Tissues », *Circ. Res.*, vol. 96, n° 3, p. 384-391, févr. 2005, doi: 10.1161/01.RES.0000156652.99586.9f.
- [197] P. Andriopoulou, P. Navarro, A. Zanetti, M. G. Lampugnani, et E. Dejana, « Histamine Induces Tyrosine Phosphorylation of Endothelial Cell-to-Cell Adherens Junctions », *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 19, n° 10, p. 2286-2297, oct. 1999, doi: 10.1161/01.ATV.19.10.2286.
- [198] D. J. Angelini *et al.*, « TNF-alpha increases tyrosine phosphorylation of vascular endothelial cadherin and opens the paracellular pathway through fyn activation in human lung endothelia », *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, vol. 291, n° 6, p. L1232-1245, déc. 2006, doi: 10.1152/ajplung.00109.2006.
- [199] A. S. Wolberg et R. A. Campbell, « Thrombin Generation, Fibrin Clot Formation and Hemostasis », *Transfus. Apher. Sci. Off. J. World Apher. Assoc. Off. J. Eur. Soc. Haemapheresis*, vol. 38, n° 1, p. 15-23, févr. 2008, doi: 10.1016/j.transci.2007.12.005.
- [200] M.-J. Rabet, J.-L. Plantier, Y. Rival, Y. Genoux, M.-G. Lampugnani, et E. Dejana, « Thrombin-Induced Increase in Endothelial Permeability Is Associated With Changes in Cell-to-Cell Junction Organization », *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 16, n° 3, p. 488-496, mars 1996, doi: 10.1161/01.ATV.16.3.488.
- [201] J. A. Royall, R. L. Berkow, J. S. Beckman, M. K. Cunningham, S. Matalon, et B. A. Freeman, « Tumor necrosis factor and interleukin 1 alpha increase vascular endothelial permeability », *Am. J. Physiol.*, vol. 257, n° 6 Pt 1, p. L399-410, déc. 1989, doi: 10.1152/ajplung.1989.257.6.L399.
- [202] E. Dejana, F. Orsenigo, et M. G. Lampugnani, « The role of adherens junctions and VE-cadherin in the control of vascular permeability », *J. Cell Sci.*, vol. 121, n° 13, p. 2115-2122, juill. 2008, doi: 10.1242/jcs.017897.
- [203] U. Nam, S. Kim, J. Park, et J. S. Jeon, « Lipopolysaccharide-Induced Vascular Inflammation Model on Microfluidic Chip », *Micromachines*, vol. 11, n° 8, p. 747, juill. 2020, doi: 10.3390/mi11080747.
- [204] J. Y. Park, H. O. Kim, K.-D. Kim, S. K. Kim, S. K. Lee, et H. Jung, « Monitoring the status of T-cell activation in a microfluidic system », *Analyst*, vol. 136, n° 13, p. 2831-2836, juin 2011, doi: 10.1039/C1AN15038C.
- [205] W.-H. Wu *et al.*, « A capillary-endothelium-mimetic microfluidic chip for the study of immune responses », *Sens. Actuators B Chem.*, vol. 209, p. 470-477, mars 2015, doi: 10.1016/j.snb.2014.11.123.
- [206] P. N. Ingram, L. E. Hind, J. A. Jimenez-Torres, A. Huttenlocher, et D. J. Beebe, « An Accessible Organotypic Microvessel Model Using iPSC-Derived Endothelium », *Adv. Healthc. Mater.*, vol. 7, n° 2, p. 1700497, 2018, doi: 10.1002/adhm.201700497.
- [207] A. Thomas, H. Daniel Ou-Yang, L. Lowe-Krentz, V. R. Muzykantov, et Y. Liu, « Biomimetic channel modeling local vascular dynamics of pro-inflammatory endothelial changes », *Biomicrofluidics*, vol. 10, n° 1, p. 014101, janv. 2016, doi: 10.1063/1.4936672.

- [208] R. Usuba, J. Pauty, F. Soncin, et Y. T. Matsunaga, « EGFL7 regulates sprouting angiogenesis and endothelial integrity in a human blood vessel model », *Biomaterials*, vol. 197, p. 305-316, mars 2019, doi: 10.1016/j.biomaterials.2019.01.022.
- [209] F. Sharifi *et al.*, « A Foreign Body Response-on-a-Chip Platform », *Adv. Healthc. Mater.*, vol. 8, n° 4, p. 1801425, 2019, doi: 10.1002/adhm.201801425.
- [210] B. Srinivasan, A. R. Kolli, M. B. Esch, H. E. Abaci, M. L. Shuler, et J. J. Hickman, « TEER Measurement Techniques for In Vitro Barrier Model Systems », *J. Lab. Autom.*, vol. 20, n° 2, p. 107-126, avr. 2015, doi: 10.1177/2211068214561025.
- [211] M. W. van der Helm *et al.*, « Direct quantification of transendothelial electrical resistance in organs-on-chips », *Biosens. Bioelectron.*, vol. 85, p. 924-929, nov. 2016, doi: 10.1016/j.bios.2016.06.014.
- [212] L.-J. Chen, B. Raut, N. Nagai, T. Abe, et H. Kaji, « Prototyping a Versatile Two-Layer Multi-Channel Microfluidic Device for Direct-Contact Cell-Vessel Co-Culture », *Micromachines*, vol. 11, n° 1, Art. n° 1, janv. 2020, doi: 10.3390/mi11010079.
- [213] H. Xu *et al.*, « A dynamic in vivo-like organotypic blood-brain barrier model to probe metastatic brain tumors », *Sci. Rep.*, vol. 6, n° 1, p. 36670, déc. 2016, doi: 10.1038/srep36670.
- [214] A. Nicolas *et al.*, « High throughput transepithelial electrical resistance (TEER) measurements on perfused membrane-free epithelia », *Lab. Chip*, vol. 21, n° 9, p. 1676-1685, 2021, doi: 10.1039/D0LC00770F.
- [215] P. P. Partyka *et al.*, « Mechanical stress regulates transport in a compliant 3D model of the blood-brain barrier », *Biomaterials*, vol. 115, p. 30-39, janv. 2017, doi: 10.1016/j.biomaterials.2016.11.012.
- [216] Y. B. Arık *et al.*, « Barriers-on-chips: Measurement of barrier function of tissues in organs-on-chips », *Biomicrofluidics*, vol. 12, n° 4, p. 042218, juin 2018, doi: 10.1063/1.5023041.
- [217] S. Alimperti *et al.*, « Three-dimensional biomimetic vascular model reveals a RhoA, Rac1, and N-cadherin balance in mural cell-endothelial cell-regulated barrier function », *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 114, n° 33, p. 8758-8763, août 2017, doi: 10.1073/pnas.1618333114.
- [218] J. A. Kim, H. N. Kim, S.-K. Im, S. Chung, J. Y. Kang, et N. Choi, « Collagen-based brain microvasculature model *in vitro* using three-dimensional printed template », *Biomicrofluidics*, vol. 9, n° 2, p. 024115, mars 2015, doi: 10.1063/1.4917508.
- [219] M. Virumbrales-Muñoz, J. Chen, J. Ayuso, M. Lee, E. J. Abel, et D. J. Beebe, « Organotypic primary blood vessel models of clear cell renal cell carcinoma for single-patient clinical trials », *Lab. Chip*, vol. 20, n° 23, p. 4420-4432, 2020, doi: 10.1039/D0LC00252F.
- [220] W. Y. Wang, D. Lin, E. H. Jarman, W. J. Polacheck, et B. M. Baker, « Functional angiogenesis requires microenvironmental cues balancing endothelial cell migration and proliferation », *Lab. Chip*, vol. 20, n° 6, p. 1153-1166, 2020, doi: 10.1039/C9LC01170F.
- [221] C. Ramón-Lozano, C. Dessalles, A. Babataheri, et A. Barakat, « Assessment of the permeability of a microvessel-on-chip to small and large molecules », *Comput. Methods Biomech. Biomed. Engin.*, vol. 23, n° sup1, p. S250-S252, oct. 2020, doi: 10.1080/10255842.2020.1815324.
- [222] V. van Duinen *et al.*, « 96 perfusable blood vessels to study vascular permeability in vitro », *Sci. Rep.*, vol. 7, n° 1, p. 18071, déc. 2017, doi: 10.1038/s41598-017-14716-y.
- [223] W. J. Polacheck *et al.*, « A non-canonical Notch complex regulates adherens junctions and vascular barrier function », *Nature*, vol. 552, n° 7684, p. 258-262, déc. 2017, doi: 10.1038/nature24998.
- [224] A. Hasan, A. Paul, A. Memic, et A. Khademhosseini, « A multilayered microfluidic blood vessel-like structure », *Biomed. Microdevices*, vol. 17, n° 5, p. 88, oct. 2015, doi: 10.1007/s10544-015-9993-2.
- [225] A. Junaid, A. Mashaghi, T. Hankemeier, et P. Vulto, « An end-user perspective on Organ-on-a-Chip: Assays and usability aspects », *Curr. Opin. Biomed. Eng.*, vol. 1, p. 15-22, mars 2017, doi: 10.1016/j.cobme.2017.02.002.

- [226] N. R. Wevers *et al.*, « A perfused human blood–brain barrier on-a-chip for high-throughput assessment of barrier function and antibody transport », *Fluids Barriers CNS*, vol. 15, n° 1, p. 23, déc. 2018, doi: 10.1186/s12987-018-0108-3.
- [227] Q. Si et R. Liu, « Screening of angiogenesis inhibitors using a 3D vascular microfluidic chip to achieve contraception », *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 515, n° 1, p. 92-98, juill. 2019, doi: 10.1016/j.bbrc.2019.05.110.
- [228] M. T. Rogers *et al.*, « A high-throughput microfluidic bilayer co-culture platform to study endothelial-pericyte interactions », *Sci. Rep.*, vol. 11, n° 1, p. 12225, déc. 2021, doi: 10.1038/s41598-021-90833-z.
- [229] M. D. Abramoff, « Image Processing with ImageJ », *Biophotonics Int.*, vol. 11, n° 7, p. 36-42, 2004.
- [230] B. Schmid, J. Schindelin, A. Cardona, M. Longair, et M. Heisenberg, « SAofthwaige h-level 3D visualization API for Java and ImageJ », p. 7, 2010.
- [231] « Microfabrication Inside Capillaries Using Multiphase Laminar Flow Patterning ». <http://www.science.org/doi/epdf/10.1126/science.285.5424.83> (consulté le sept. 28, 2021).
- [232] V. Hosseini *et al.*, « Healthy and diseased *in vitro* models of vascular systems », *Lab. Chip*, vol. 21, n° 4, p. 641-659, 2021, doi: 10.1039/D0LC00464B.
- [233] G. Lai, Y. Li, et G. Li, « Effect of concentration and temperature on the rheological behavior of collagen solution », *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 42, n° 3, p. 285-291, avr. 2008, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2007.12.010.
- [234] M. Takeichi et T. Okada, « Roles of magnesium and calcium ions in cell-to-substrate adhesion », *Exp. Cell Res.*, vol. 74, n° 1, p. 51-60, sept. 1972, doi: 10.1016/0014-4827(72)90480-6.
- [235] R. O. Hynes, « Integrins: Versatility, modulation, and signaling in cell adhesion », *Cell*, vol. 69, n° 1, p. 11-25, avr. 1992, doi: 10.1016/0092-8674(92)90115-S.
- [236] M. Akbari, D. Sinton, et M. Bahrami, « Pressure Drop in Rectangular Microchannels as Compared With Theory Based on Arbitrary Cross Section », *J. Fluids Eng.*, vol. 131, n° 4, p. 041202, avr. 2009, doi: 10.1115/1.3077143.
- [237] B. Delaval et S. J. Doxsey, « Pericentrin in cellular function and disease », *J. Cell Biol.*, vol. 188, n° 2, p. 181-190, janv. 2010, doi: 10.1083/jcb.200908114.
- [238] N. Wettschureck, B. Strilic, et S. Offermanns, « Passing the Vascular Barrier: Endothelial Signaling Processes Controlling Extravasation », *Physiol. Rev.*, vol. 99, n° 3, p. 1467-1525, juill. 2019, doi: 10.1152/physrev.00037.2018.
- [239] V. Makó *et al.*, « Proinflammatory activation pattern of human umbilical vein endothelial cells induced by IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , and LPS », *Cytometry A*, vol. 77A, n° 10, p. 962-970, 2010, doi: 10.1002/cyto.a.20952.
- [240] M. Romano *et al.*, « Role of IL-6 and Its Soluble Receptor in Induction of Chemokines and Leukocyte Recruitment », *Immunity*, vol. 6, n° 3, p. 315-325, mars 1997, doi: 10.1016/S1074-7613(00)80334-9.
- [241] S. Magder, J. Neculcea, V. Neculcea, et R. Sladek, « Lipopolysaccharide and TNF- $\alpha$  Produce Very Similar Changes in Gene Expression in Human Endothelial Cells », *J. Vasc. Res.*, vol. 43, n° 5, p. 447-461, 2006, doi: 10.1159/000095162.
- [242] T. Murakami *et al.*, « The Gene Expression Profile of Human Umbilical Vein Endothelial Cells Stimulated by Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  Using DNA Microarray Analysis », *J. Atheroscler. Thromb.*, vol. 7, n° 1, p. 39-44, 2000, doi: 10.5551/jat1994.7.39.
- [243] D. Viemann *et al.*, « Transcriptional profiling of IKK2/NF- $\kappa$ B- and p38 MAP kinase-dependent gene expression in TNF- $\alpha$ -stimulated primary human endothelial cells », vol. 103, n° 9, p. 9, 2004.
- [244] Y.-Y. Yang, C.-J. Hu, S.-M. Chang, T.-Y. Tai, et S.-J. Leu, « Aspirin inhibits monocyte chemoattractant protein-1 and interleukin-8 expression in TNF- $\alpha$  stimulated human umbilical vein endothelial cells », *Atherosclerosis*, vol. 174, n° 2, p. 207-213, juin 2004, doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2004.01.024.
- [245] X.-Y. Man, X.-H. Yang, S.-Q. Cai, Y.-G. Yao, et M. Zheng, « Immunolocalization and Expression of Vascular Endothelial Growth Factor Receptors (VEGFRs) and Neuropilins (NRPs) on

- Keratinocytes in Human Epidermis », *Mol. Med.*, vol. 12, n° 7, Art. n° 7, juill. 2006, doi: 10.2119/2006-00024.Man.
- [246] O. Saijonmaa, T. Nyman, et F. Fyhrquist, « Downregulation of Angiotensin-Converting Enzyme by Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  and Interleukin-1 $\beta$  in Cultured Human Endothelial Cells », *J. Vasc. Res.*, vol. 38, n° 4, p. 370-378, 2001, doi: 10.1159/000051068.
- [247] G. Bendas et L. Borsig, « Cancer Cell Adhesion and Metastasis: Selectins, Integrins, and the Inhibitory Potential of Heparins », *Int. J. Cell Biol.*, vol. 2012, p. 1-10, 2012, doi: 10.1155/2012/676731.
- [248] N. Reymond, B. B. d'Água, et A. J. Ridley, « Crossing the endothelial barrier during metastasis », *Nat. Rev. Cancer*, vol. 13, n° 12, p. 858-870, déc. 2013, doi: 10.1038/nrc3628.
- [249] K. Aukland et R. K. Reed, « Interstitial-lymphatic mechanisms in the control of extracellular fluid volume », *Physiol. Rev.*, janv. 1993, doi: 10.1152/physrev.1993.73.1.1.
- [250] J. Pauty *et al.*, « A Vascular Permeability Assay Using an In Vitro Human Microvessel Model Mimicking the Inflammatory Condition », *Nanotheranostics*, vol. 1, n° 1, p. 103-113, mars 2017, doi: 10.7150/ntno.18303.
- [251] V. H. Huxley, F. E. Curry, et R. H. Adamson, « Quantitative fluorescence microscopy on single capillaries: alpha-lactalbumin transport », *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.*, vol. 252, n° 1, p. H188-H197, janv. 1987, doi: 10.1152/ajpheart.1987.252.1.H188.
- [252] A. Armulik, A. Abramsson, et C. Betsholtz, « Endothelial/Pericyte Interactions », *Circ. Res.*, vol. 97, n° 6, p. 512-523, sept. 2005, doi: 10.1161/01.RES.0000182903.16652.d7.
- [253] D. E. Sims, « The pericyte—A review », *Tissue Cell*, vol. 18, n° 2, p. 153-174, janv. 1986, doi: 10.1016/0040-8166(86)90026-1.
- [254] A. Armulik, G. Genové, et C. Betsholtz, « Pericytes: Developmental, Physiological, and Pathological Perspectives, Problems, and Promises », *Dev. Cell*, vol. 21, n° 2, p. 193-215, août 2011, doi: 10.1016/j.devcel.2011.07.001.
- [255] Z. Fu, L. Wang, S. Li, F. Chen, K. K.-W. Au-Yeung, et C. Shi, « MicroRNA as an Important Target for Anticancer Drug Development », *Front. Pharmacol.*, vol. 12, p. 2212, 2021, doi: 10.3389/fphar.2021.736323.
- [256] X. Sun *et al.*, « MicroRNA-181b regulates NF- $\kappa$ B-mediated vascular inflammation », *J. Clin. Invest.*, p. JCI61495, mai 2012, doi: 10.1172/JCI61495.
- [257] H. S. Cheng *et al.*, « MicroRNA-146 represses endothelial activation by inhibiting pro-inflammatory pathways », *EMBO Mol. Med.*, vol. 5, n° 7, p. 1017-1034, juill. 2013, doi: 10.1002/emmm.201202318.
- [258] L. Poissonnier, G. Villain, F. Soncin, et V. Mattot, « miR126-5p repression of ALCAM and SetD5 in endothelial cells regulates leucocyte adhesion and transmigration », *Cardiovasc. Res.*, vol. 102, n° 3, p. 436-447, juin 2014, doi: 10.1093/cvr/cvu040.
- [259] M. M. Mahmoud *et al.*, « Shear stress induces endothelial-to-mesenchymal transition via the transcription factor Snail », *Sci. Rep.*, vol. 7, n° 1, p. 3375, déc. 2017, doi: 10.1038/s41598-017-03532-z.
- [260] B. J. Kim *et al.*, « Bacterial induction of Snail1 contributes to blood-brain barrier disruption », *J. Clin. Invest.*, vol. 125, n° 6, p. 2473-2483, juin 2015, doi: 10.1172/JCI74159.
- [261] C.-W. Lo *et al.*, « IL-6 Trans-Signaling in Formation and Progression of Malignant Ascites in Ovarian Cancer », *Cancer Res.*, vol. 71, n° 2, p. 424-434, janv. 2011, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-1496.
- [262] T. R. Desai, N. J. Leeper, K. L. Hynes, et B. L. Gewertz, « Interleukin-6 Causes Endothelial Barrier Dysfunction via the Protein Kinase C Pathway », *J. Surg. Res.*, vol. 104, n° 2, p. 118-123, mai 2002, doi: 10.1006/jsre.2002.6415.
- [263] H. Alsaffar, N. Martino, J. P. Garrett, et A. P. Adam, « Interleukin-6 promotes a sustained loss of endothelial barrier function via Janus kinase-mediated STAT3 phosphorylation and de novo protein synthesis », *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.*, vol. 314, n° 5, p. C589-C602, mai 2018, doi: 10.1152/ajpcell.00235.2017.

- [264] S. Rose-John, « IL-6 Trans-Signaling via the Soluble IL-6 Receptor: Importance for the Pro-Inflammatory Activities of IL-6 », *Int. J. Biol. Sci.*, vol. 8, n° 9, p. 1237-1247, 2012, doi: 10.7150/ijbs.4989.
- [265] J. Martinez-Fabregas *et al.*, « CDK8 Fine-Tunes IL-6 Transcriptional Activities by Limiting STAT3 Resident Time at the Gene Loci », *Cell Rep.*, vol. 33, n° 12, p. 108545, déc. 2020, doi: 10.1016/j.celrep.2020.108545.
- [266] J. Martinez-Fabregas *et al.*, « Kinetics of cytokine receptor trafficking determine signaling and functional selectivity », *eLife*, vol. 8, p. e49314, doi: 10.7554/eLife.49314.
- [267] Q. Wang, S. Yang, K. Wang, et S.-Y. Sun, « MET inhibitors for targeted therapy of EGFR TKI-resistant lung cancer », *J. Hematol. Oncol. J Hematol Oncol*, vol. 12, n° 1, p. 63, juin 2019, doi: 10.1186/s13045-019-0759-9.
- [268] R. A. De Mello *et al.*, « The Role of MET Inhibitor Therapies in the Treatment of Advanced Non-Small Cell Lung Cancer », *J. Clin. Med.*, vol. 9, n° 6, p. 1918, juin 2020, doi: 10.3390/jcm9061918.
- [269] F. Liu *et al.*, « Hepatocyte growth factor enhances endothelial cell barrier function and cortical cytoskeletal rearrangement: potential role of glycogen synthase kinase-3 $\beta$  », *FASEB J.*, vol. 16, n° 9, p. 950-962, juill. 2002, doi: 10.1096/fj.01-0870com.
- [270] Y. Yang, Q. Chen, A. Liu, X. Xu, J. Han, et H. Qiu, « Synergism of MSC-secreted HGF and VEGF in stabilising endothelial barrier function upon lipopolysaccharide stimulation via the Rac1 pathway », *Stem Cell Res. Ther.*, vol. 6, n° 1, p. 250, déc. 2015, doi: 10.1186/s13287-015-0257-0.
- [271] L. Díaz-Flores *et al.*, « Pericytes. Morphofunction, interactions and pathology in a quiescent and activated mesenchymal cell niche », *Histol. Histopathol.*, vol. 24, n° 7, p. 909-969, juill. 2009, doi: 10.14670/HH-24.909.
- [272] J.-H. Paik *et al.*, « Sphingosine 1-phosphate receptor regulation of N-cadherin mediates vascular stabilization », *Genes Dev.*, vol. 18, n° 19, p. 2392-2403, oct. 2004, doi: 10.1101/gad.1227804.
- [273] A. C. Newman, M. N. Nakatsu, W. Chou, P. D. Gershon, et C. C. W. Hughes, « The requirement for fibroblasts in angiogenesis: fibroblast-derived matrix proteins are essential for endothelial cell lumen formation », *Mol. Biol. Cell*, vol. 22, n° 20, p. 3791-3800, oct. 2011, doi: 10.1091/mbc.E11-05-0393.
- [274] Y.-H. Hsu, M. L. Moya, C. C. W. Hughes, S. C. George, et A. P. Lee, « A microfluidic platform for generating large-scale nearly identical human microphysiological vascularized tissue arrays », *Lab. Chip*, vol. 13, n° 15, p. 2990-2998, août 2013, doi: 10.1039/c3lc50424g.
- [275] M. B. Chen, J. A. Whisler, J. S. Jeon, et R. D. Kamm, « Mechanisms of tumor cell extravasation in an in vitro microvascular network platform », *Integr. Biol. Quant. Biosci. Nano Macro*, vol. 5, n° 10, p. 1262-1271, oct. 2013, doi: 10.1039/c3ib40149a.
- [276] E. A. Margolis *et al.*, « Stromal cell identity modulates vascular morphogenesis in a microvasculature-on-a-chip platform », *Lab. Chip*, vol. 21, n° 6, p. 1150-1163, 2021, doi: 10.1039/D0LC01092H.
- [277] S. Pinte *et al.*, « Endothelial Cell Activation Is Regulated by Epidermal Growth Factor-like Domain 7 (Egfl7) during Inflammation », *J. Biol. Chem.*, vol. 291, n° 46, p. 24017-24028, nov. 2016, doi: 10.1074/jbc.M116.731331.
- [278] M. Corada *et al.*, « Vascular endothelial-cadherin is an important determinant of microvascular integrity in vivo », *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 96, n° 17, p. 9815-9820, août 1999, doi: 10.1073/pnas.96.17.9815.
- [279] R. Daneman, L. Zhou, A. A. Kebede, et B. A. Barres, « Pericytes are required for blood-brain barrier integrity during embryogenesis », *Nature*, vol. 468, n° 7323, p. 562-566, nov. 2010, doi: 10.1038/nature09513.
- [280] A. Armulik *et al.*, « Pericytes regulate the blood-brain barrier », *Nature*, vol. 468, n° 7323, p. 557-561, nov. 2010, doi: 10.1038/nature09522.
- [281] J. Hamzah *et al.*, « Vascular normalization in Rgs5-deficient tumours promotes immune destruction », *Nature*, vol. 453, n° 7193, p. 410-414, mai 2008, doi: 10.1038/nature06868.

- [282] R. J. Dekker *et al.*, « Prolonged fluid shear stress induces a distinct set of endothelial cell genes, most specifically lung Krüppel-like factor (KLF2) », *Blood*, vol. 100, n° 5, p. 1689-1698, sept. 2002, doi: 10.1182/blood-2002-01-0046.
- [283] R. Santamaría, M. González-Álvarez, R. Delgado, S. Esteban, et A. G. Arroyo, « Remodeling of the Microvasculature: May the Blood Flow Be With You », *Front. Physiol.*, vol. 11, p. 1256, 2020, doi: 10.3389/fphys.2020.586852.
- [284] S. Fleischer, D. N. Tavakol, et G. Vunjak-Novakovic, « From Arteries to Capillaries: Approaches to Engineering Human Vasculature », *Adv. Funct. Mater.*, vol. 30, n° 37, p. 1910811, 2020, doi: 10.1002/adfm.201910811.
- [285] G. Calibasi Kocal *et al.*, « Dynamic Microenvironment Induces Phenotypic Plasticity of Esophageal Cancer Cells Under Flow », *Sci. Rep.*, vol. 6, n° 1, p. 38221, déc. 2016, doi: 10.1038/srep38221.
- [286] A. M. A. O. Pollet et J. M. J. den Toonder, « Recapitulating the Vasculature Using Organ-On-Chip Technology », *Bioengineering*, vol. 7, n° 1, p. 17, févr. 2020, doi: 10.3390/bioengineering7010017.