



HAL
open science

Développement d'un dispositif microfluidique pour la vascularisation fonctionnelle d'organoïdes-sur-puce

Clément Quintard

► **To cite this version:**

Clément Quintard. Développement d'un dispositif microfluidique pour la vascularisation fonctionnelle d'organoïdes-sur-puce. Médecine humaine et pathologie. Université Grenoble Alpes [2020-..], 2022. Français. <NNT : 2022GRALS022>. <tel-03867605>

HAL Id: tel-03867605

<https://theses.hal.science/tel-03867605v1>

Submitted on 23 Nov 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.



HAL Authorization

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES

Spécialité : BIS – Biotechnologie, instrumentation, signal et imagerie pour la biologie, la médecine et l'environnement

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

Clément QUINTARD

Thèse dirigée par **Xavier GIDROL**, Directeur de Recherche, CEA et co-dirigée par **Yves FOUILLET**, Ingénieur Chercheur, CEA et co-encadrée par **Jean-Luc ACHARD**, Directeur de Recherche Émérite, CNRS

préparée au sein du **Laboratoire des Systèmes Microfluidiques et de Bio-Ingénierie** dans l'**École Doctorale Ingénierie pour la Santé la Cognition et l'Environnement**

Développement d'un dispositif microfluidique pour la vascularisation fonctionnelle d'organoïdes-sur-puce

Development of a microfluidic device for functional vascularization of organoids-on-chip

Thèse soutenue publiquement le **22 mars 2022**, devant le jury composé de :

Monsieur Walid RACHIDI

Professeur des Universités, Université Grenoble Alpes, Président

Madame Stéphanie DESCROIX

Directeur de Recherche, Institut Curie, Rapporteur

Madame Cécile LEGALLAIS

Directeur de Recherche, UTC Compiègne, Rapporteur

Monsieur Charles BAROUD

Professeur, École Polytechnique, Examineur

Monsieur Xavier GIDROL

Directeur de Recherche, CEA, Directeur de thèse

Monsieur Yves FOUILLET

Ingénieur Chercheur, CEA, Co-directeur de thèse

Monsieur Jean-Luc ACHARD

Directeur de Recherche Émérite, CNRS, Co-encadrant de thèse, Invité



Remerciements

En premier lieu, je souhaite remercier mes encadrants qui m'ont accompagné pendant ces trois ans et quatre mois d'aventure. J'ai bénéficié des expertises de mes directeurs de thèse Xavier Gidrol et Yves Fouillet dans leurs domaines respectifs de la biologie et de la microfluidique ; ce fut absolument nécessaire pour mener à bien cette thèse pluridisciplinaire. Jean-Luc Achard, mon encadrant CEA spécialiste de la mécanique des fluides, a également été extrêmement présent pendant toute la durée de ma thèse ; son aide fut précieuse à bien des égards. Fabrice Navarro, chef du laboratoire LSMB, a également joué un rôle prépondérant dans l'accompagnement de ma thèse. Je les remercie tous les quatre pour leur bienveillance, pour les nombreuses discussions que nous avons pu avoir ensemble, pour leur aide générale, pour la liberté qu'ils m'ont donnée dans mon travail et pour leur confiance.

Je souhaite également remercier l'ensemble des membres du jury. Merci à Walid Rachidi, Président du jury, d'avoir accepté ce rôle avec passion et conviction. Merci à Stéphanie Descroix et Cécile Legallais, rapporteuses, et Charles Baroud, examinateur, pour leurs analyses approfondies de mon manuscrit et leurs retours constructifs. Les discussions que j'ai eues avec chacun de vous à la suite de ma présentation furent passionnantes et enrichissantes.

Les travaux effectués pendant cette thèse n'auraient également pas pu aboutir sans l'aide précieuse d'une multitude de personnes d'horizons variés, ainsi je tiens à adresser un grand merci à tous ceux avec qui j'ai pu travailler, des biologistes de Biomix à l'équipe packaging du LSMB en passant par les opticiens du LSIV, la team du L2 145, celle du projet PANACHE, les experts microfluidiques du LSMB etc. Je veux aussi remercier toute l'équipe du Penninger Lab, grâce à qui ma thèse a pu prendre une autre dimension.

Je remercie toutes les personnes qui m'ont permis de passer de si bons moments au CEA, entre thésards, postdocs, stagiaires, nous avons partagé de nombreux repas, pauses café et autres moments précieux pendant une thèse.

Je remercie enfin ma famille, mes proches, mes amis, ma femme, pour leur soutien durant toutes ces années.

Table des matières

Chapitre 1 :	9
Etat de l’art sur les organes-sur-puce, les organoïdes et les organes-sur-puce vascularisés	9
Partie 1 : Contexte général	11
1 Introduction.....	11
2 Les modèles de test de médicament actuels	13
2.1 Le développement d’un nouveau médicament	13
2.2 Limites des modèles actuels.....	16
3 Les organes-sur-puce.....	18
3.1 Définition.....	18
3.2 Observation	20
3.3 Potentiel pour l’industrie	21
4 Les organoïdes et les organoïdes-sur-puce	22
Partie 2 : Réseaux microvasculaires sur puce : vers une facilité d’utilisation des dispositifs microfluidiques et des organoïdes vascularisés sur puce	25
1 Introduction.....	25
2 Développer des réseaux microvasculaires <i>in vitro</i>	27
2.1 Architecture microfluidique	28
2.2 Nature des cellules et mise en culture	31
2.3 Nature de l’hydrogel et injection dans la puce	32
2.4 Incorporation d’organoïdes/sphéroïdes	34
3 Contrôle des écoulements.....	35
3.1 Différentes approches pour générer l’écoulement.....	35
3.2 Evaluation de la pertinence physiologique des flux générés	38
4 Vers une automatisation et une industrialisation des dispositifs microfluidiques	39
4.1 Fabrication des puces microfluidiques, parallélisation et standardisation.....	40
4.2 Intégration des fonctions de suivi et de détection sur puce	41
5 Vascularisation d’organoïdes-sur-puce	43
6 Conclusion et perspectives.....	45
Bibliographie.....	46
Chapitre 2 : Plateforme microfluidique innovante pour la perfusion d’organoïdes-sur-puce	53
1 Introduction.....	55
2 Brique élémentaire du circuit microfluidique proposé	57

2.1	Dimensionnement du circuit microfluidique, simplification du contrôle des écoulements .	59
2.2	Caractérisation géométrique de l'unité de piégeage des sphéroïdes / organoïdes	60
2.2.1	Règles de dimensionnement géométrique du piège	61
2.2.2	Unités de piégeage multiples, mise en série.....	65
2.3	Exploitation de l'architecture en serpentin pour les organes-sur-puces vascularisés.....	66
3	Procédé d'injection innovant dans le dispositif microfluidique choisi.....	66
3.1	Méthode originale et robuste d'encapsulation permanente de sphéroïdes	66
3.1.1	Généralités	66
3.1.2	Caractéristiques du dispositif microfluidique.....	67
3.1.3	Mise en œuvre du système	67
3.1.4	Autres modes de réalisation possibles.....	72
3.2	Vascularisation	75
4	Evaluation des paramètres de contrôle du dépôt du gel dans le canal microfluidique.....	80
4.1	Observation du dépôt de gel dans les coins et sur les parois du canal microfluidique	80
4.2	Présentation d'une approche fondamentale	81
	Annexe A	85
	Choix du matériau	85
	Conception et usinage des puces microfluidiques.....	85
	Annexe B.....	87
	Bibliographie.....	88
	Chapitre 3 :	91
	Plateforme microfluidique automatisée pour la vascularisation d'organoïdes-sur-puce	91
1	Introduction.....	93
1.1	Idée directrice.....	93
1.2	Contexte de l'étude	93
2	Matériel et méthodes.....	94
2.1	Piégeage de l'organoïde et ensemencement de la puce microfluidique	95
2.2	Culture cellulaire et génération des sphéroïdes et des organoïdes.....	95
2.3	Préparation de l'hydrogel.....	96
2.4	Fabrication du dispositif	97
2.5	Imagerie cellulaire	97
2.6	Microscope à fluorescence à feuille de lumière.....	98
2.7	Immunomarquage sur puce	99
2.8	Analyse des réseaux endothéliaux	99
2.9	Analyse statistique	99
3	Résultats	100

3.1	Conception d'un dispositif microfluidique pour le piégeage précis d'organoïdes et de leur micro-environnement	100
3.2	Formation de réseaux endothéliaux interconnectés	102
3.3	Fonctionnalité du réseau endothélial	105
3.4	Organoïdes de vaisseaux sanguins	108
3.5	Anastomose entre réseaux endothéliaux et organoïdes	110
3.6	Organoïdes de cœur	115
4	Conclusion	117
	Annexe A	119
	Bibliographie.....	121
	Chapitre 4 : Perfectionnement de l'architecture en serpent in par un système de vannes pour la perfusion d'îlots pancréatiques	125
1	Introduction.....	127
1.1	Idée directrice.....	127
1.2	Contexte de l'étude	127
2	Matériel et méthodes.....	129
2.1	Ilots pancréatiques humains	129
2.2	Test de sécrétion d'insuline stimulée par le glucose (test GSIS)	130
2.3	Principe de piégeage et injection des îlots de Langerhans	131
2.4	Simulation numérique de la dynamique de l'écoulement	131
2.5	Quantification de l'insuline	132
2.6	Viabilité des îlots	132
2.7	Imagerie.....	132
2.8	Conception et fabrication des puces.....	132
2.9	Modélisation de la déformation hyperélastique de la membrane	134
3	Résultats	135
3.1	Modélisation de la membrane hyperélastique dans une puce microfluidique dédiée	135
3.2	Validation des vannes pour la puce microfluidique de perfusion d'îlots de Langerhans....	138
3.3	Piégeage des îlots et taux de cisaillement associés	140
3.4	Validation du protocole flu idique et perfusion de l'îlot	141
4	Conclusion	147
	Annexe A	148
	Annexe B.....	154
	Bibliographie.....	156
	Chapitre 5 : Conclusions et perspectives	159
1	Perspectives d'amélioration de l'architecture en serpent in	162

1.1	Vascularisation d'îlots pancréatiques sur puce	162
1.2	Mesurer la cinétique de sécrétion d'un îlot pancréatique sur puce	164
1.3	Intégration d'un test ELISA sur puce	164
1.4	Intégration du contrôle des écoulements sur puce	165
1.5	Optimisation de la conception des vannes et simplification du banc expérimental	166
1.6	Vers de meilleures performances : mise en série des unités de piégeage	166
1.7	Modélisation du dépôt du gel dans le canal microfluidique	167
2	Perspectives plus générales pour les organoïdes-sur-puce	167
2.1	Perfusion intravasculaire	167
2.2	Effet de l'écoulement sur le développement des organoïdes	169
2.3	Incorporer des cellules du système immunitaire	170
2.4	Etablir des modèles de maladies	170
2.5	Etudier les interactions entre organes	171
	Bibliographie.....	173
	Annexe 1.....	174
	Annexe 2.....	192

Chapitre 1 :

Etat de l'art sur les organes-sur-puce, les organoïdes et les organes-sur-puce vascularisés

Chapitre 1

Chapitre 1 :	9
Etat de l'art sur les organes-sur-puce, les organoïdes et les organes-sur-puce vascularisés	9
Partie 1 : Contexte général	11
1 Introduction.....	11
2 Les modèles de test de médicament actuels	13
2.1 Le développement d'un nouveau médicament	13
2.2 Limites des modèles actuels.....	16
3 Les organes-sur-puce.....	18
3.1 Définition.....	18
3.2 Observation	20
3.3 Potentiel pour l'industrie	21
4 Les organoïdes et les organoïdes-sur-puce	22
Partie 2 : Réseaux microvasculaires sur puce : vers une facilité d'utilisation des dispositifs microfluidiques et des organoïdes vascularisés sur puce	25
1 Introduction.....	25
2 Développer des réseaux microvasculaires <i>in vitro</i>	27
2.1 Architecture microfluidique	28
2.2 Nature des cellules et mise en culture	31
2.3 Nature de l'hydrogel et injection dans la puce	32
2.4 Incorporation d'organoïdes/sphéroïdes	34
3 Contrôle des écoulements.....	35
3.1 Différentes approches pour générer l'écoulement.....	35
3.2 Evaluation de la pertinence physiologique des flux générés	38
4 Vers une automatisation et une industrialisation des dispositifs microfluidiques	39
4.1 Fabrication des puces microfluidiques, parallélisation et standardisation.....	40
4.2 Intégration des fonctions de suivi et de détection sur puce.....	41
5 Vascularisation d'organoïdes-sur-puce	43
6 Conclusion et perspectives.....	45
Bibliographie.....	46

Partie 1 : Contexte général

1 Introduction

Ce travail de thèse s'inscrit dans la thématique « organes-sur-puce » (organ-on-chip, OoC en anglais), branche active de la microfluidique pour applications biomédicales. De nombreuses synthèses bibliographiques ont déjà été écrites sur les organes-sur-puce¹⁻³, ainsi nous nous contenterons ici de brièvement rappeler le contexte dans lequel cette thématique a émergé dans les années 2000 (Fig. 1a et b). Les organoïdes et les organes-sur-puce vascularisés, deux sujets de recherche qui ont connu un engouement particulier ces dernières années, seront ensuite introduits. L'objet de cette thèse est de les combiner.

On peut distinguer quatre grands axes d'application des organes-sur-puce :

- L'étude de mécanismes et processus physiopathologiques relevant de **la biologie fondamentale**,
- Le **développement et criblage de nouveaux médicaments** pour l'industrie pharmaceutique,
- L'élaboration d'une **médecine personnalisée** dans les hôpitaux,
- La **médecine régénératrice** dans une perspective plus lointaine.

L'étude des organes-sur-puce ont entraîné un fort rapprochement entre des champs scientifiques aussi variés que la microfluidique, la bio-ingénierie et la biologie cellulaire, pour développer les outils de demain qui seront nécessairement de plus en plus complexes (voir sections 2 et 3). Ce rapprochement se trouve de plus favorisé par toutes les avancées observées dans ces domaines. Durant la pandémie de Covid-19 par exemple, les organes-sur-puce ont démontré leur aptitude à tester l'efficacité de nombreuses molécules sur des modèles (notamment de poumons, de cœurs et de vaisseaux sanguins) infectés par le SARS-CoV-2^{ref.4}.

En parallèle de la recherche sur les organes-sur-puce, s'est développée celle sur les **organoïdes**, tissus biologiques dérivés de cellules souches et capables de s'auto-organiser en trois dimensions⁵⁻⁸ (voir section 4). Les organoïdes constituent d'excellents modèles aussi bien pour l'étude de processus biologiques fondamentaux que pour la recherche de traitements anti-cancéreux⁹. Ils sont particulièrement intéressants en tant que modèles de maladies humaines afin d'identifier les causes d'une maladie donnée et ses traitements possibles. Cependant, il est difficile avec cette seule approche, de reconstruire les interactions proches de ce qu'elles seraient dans le véritable organe : pour une meilleure représentativité de la réalité physiologique du corps humain, on voudrait par exemple pouvoir apporter à ces organoïdes un système vasculaire fonctionnel et un microenvironnement dynamique. C'est ainsi que sont apparus récemment les **organoïdes-sur-puce**¹⁰, afin de combiner les avantages de la microfluidique et des organes-sur-puce tout en gardant la complexité biologique nécessaire des organoïdes. A terme, on pourrait imaginer connecter différents organes au sein d'une puce

microfluidique de sorte à fabriquer un « corps humain sur puce » où les interactions entre organes seraient prises en compte (Fig. 1c).

En particulier, dans le but de reproduire aussi fidèlement que possible la réalité physiologique du corps humain, de nombreux efforts se sont focalisés sur la vascularisation des organes-sur-puce ces dernières années. Dans le corps humain en effet, les organes sont reliés entre eux par le système vasculaire constitué de 60 000 km de vaisseaux sanguins qu’héberge notre corps et qui permettent d’apporter nutriments et oxygène nécessaires au bon développement des tissus biologiques. Sans ces vaisseaux sanguins, les différents organes de notre corps ne pourraient être suffisamment oxygénés, ni débarrassés de leurs déchets cellulaires tels que le dioxyde de carbone ; ils verraient ainsi se développer en leur sein un cœur nécrotique. Pourtant, cette vascularisation est omise dans la grande majorité des modèles d’organoïdes et d’organes-sur-puce actuels. Afin de pallier cette absence, de nombreux groupes de recherche ont contribué au développement d’**organes-sur-puce vascularisés**, qui seront examinés en détail en deuxième partie de ce chapitre.

Dans cette thèse, nous nous attacherons à faire le lien entre ces différentes avancées de façon synergique, afin de développer des modèles d’**organoïdes-sur-puce vascularisés**. Une grande attention sera accordée au contrôle des écoulements dans les dispositifs microfluidiques proposés, ainsi qu’à leur facilité d’utilisation.

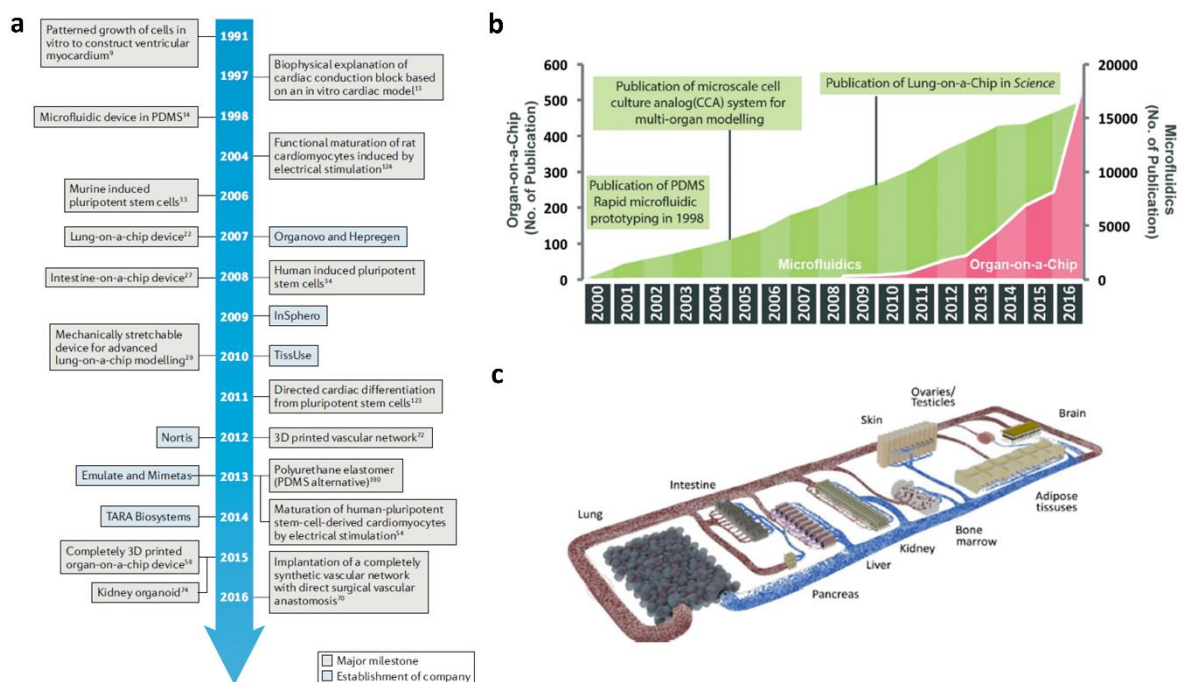


Figure 1 : **a**. Principales avancées dans les domaines de la microfluidique et des organes-sur-puce. Tiré de Zhang et al.¹¹, **b**. Augmentation du nombre de publications universitaires dans le domaine des organes-sur-puce (à partir du nombre de recherche du mot clé « Microfluidics » ou « Organ-on-a-Chip » sur Google Scholar). Tiré de Zhang et al.¹², **c**. Représentation schématique du concept de « corps humain sur puce ». Tiré de Hayden et al.¹³.

2 Les modèles de test de médicament actuels

Aujourd'hui, les cellules cultivées dans des boîtes de Petri ainsi que les animaux de laboratoire, constituent les principaux modèles utilisés pour les premières phases de développement d'un médicament ainsi que pour la recherche fondamentale sur les maladies humaines. Bien que ces modèles aient contribué à d'importantes avancées dans le domaine biomédical, ils possèdent des limites intrinsèques qui aujourd'hui poussent les chercheurs à développer des modèles alternatifs. En effet, cette section montrera pourquoi les résultats obtenus sur ces systèmes ne peuvent pas toujours être transposés à l'homme, dont la physiologie est souvent très différente. Par ailleurs, même l'humain ne constitue pas forcément un modèle parfait pour le patient, car les études cliniques sont dans un premier temps le plus souvent faites sur des volontaires en bonne santé, et ne peuvent ainsi pas nécessairement prédire les effets d'un médicament sur un autre groupe de personnes (femmes enceintes, personnes âgées, enfants, etc.).

2.1 Le développement d'un nouveau médicament

Chaque jour, des millions de personnes dans le monde consomment des médicaments dont il faudrait largement améliorer l'efficacité. Sur les dix médicaments les plus rentables pour l'industrie pharmaceutique aux États-Unis, on estime que seule une personne sur quatre bénéficie du traitement prescrit dans le meilleur des cas, et une sur vingt-cinq dans le pire d'entre eux¹⁴ (Fig. 2). Il s'agit à la fois d'un énorme gaspillage de ressources et d'une épreuve psychologique pour le patient, qui se voit attribuer un traitement qui n'a aucun effet, voire le fait souffrir d'effets secondaires indésirables. Cette mauvaise capacité à prédire l'efficacité d'un médicament sur un patient donné vient en partie de l'imperfection des modèles sur lesquels sont testés les médicaments, que nous allons brièvement décrire.



Figure 2 : Efficacité de dix médicaments parmi les plus rentables aux États-Unis. Pour chaque patient qui bénéficie d'un médicament (en vert), il y en a 3 à 24 pour lesquels il n'y a aucune réduction des symptômes (en rouge). Adapté de Schork et al.¹⁴.

Boîtes de Petri et plaques à puits :

Pour réaliser les premiers tests de médicaments en laboratoire, on utilise des supports plastiques (soit des surfaces plates appelées boîtes de Petri, soit des puits séparés et alignés par dizaines dans ce qu'on appelle des plaques à puits) dans lesquels sont cultivées des cellules. Dans ces cellules, on peut par exemple au préalable avoir inséré un morceau d'ADN défectueux pour mimer une maladie. Des robots peuvent alors déposer dans les puits (les plaques à puits sont généralement constituées de 96, 384 voire 1536 puits chacune) les différentes molécules issues d'une immense collection de médicaments candidats, afin de déterminer si les cellules réagissent ou non à une substance donnée. Suivent alors des phases d'optimisation de plus en plus complexes et coûteuses afin d'identifier les molécules les plus efficaces et les moins toxiques vis-à-vis de la cible thérapeutique.

Expérimentations animales :

L'étape suivante consiste à tester sur des animaux les substances identifiées comme médicaments potentiels. On peut par exemple modifier le génome de souris afin de créer un modèle de maladie mimant celle du patient. L'ensemble des expériences sur les animaux, exigées par les organismes de réglementation du marché des médicaments, prend plusieurs années : il s'agit de comprendre comment le médicament candidat pénètre dans les tissus, comment il est éliminé, quel est son effet sur les organes vitaux, sur les organes reproducteurs etc.

Les essais cliniques :

Après que les études sur les animaux ont donné des résultats satisfaisants, commencent des essais cliniques chez l'homme. Dans une première phase, on détermine si le médicament est sûr et s'il a un effet ; dans une deuxième phase, s'il est efficace sur un petit groupe de patients ; lors d'une troisième phase, une étude en double aveugle est menée sur un groupe plus important de patients. Ce n'est qu'une fois ces essais terminés qu'une entreprise pharmaceutique peut demander aux organismes de réglementation l'autorisation de mise sur le marché du médicament (à l'Agence Européenne du Médicament (AEM) en Europe, à la Food and Drug Administration (FDA) aux Etats-Unis).

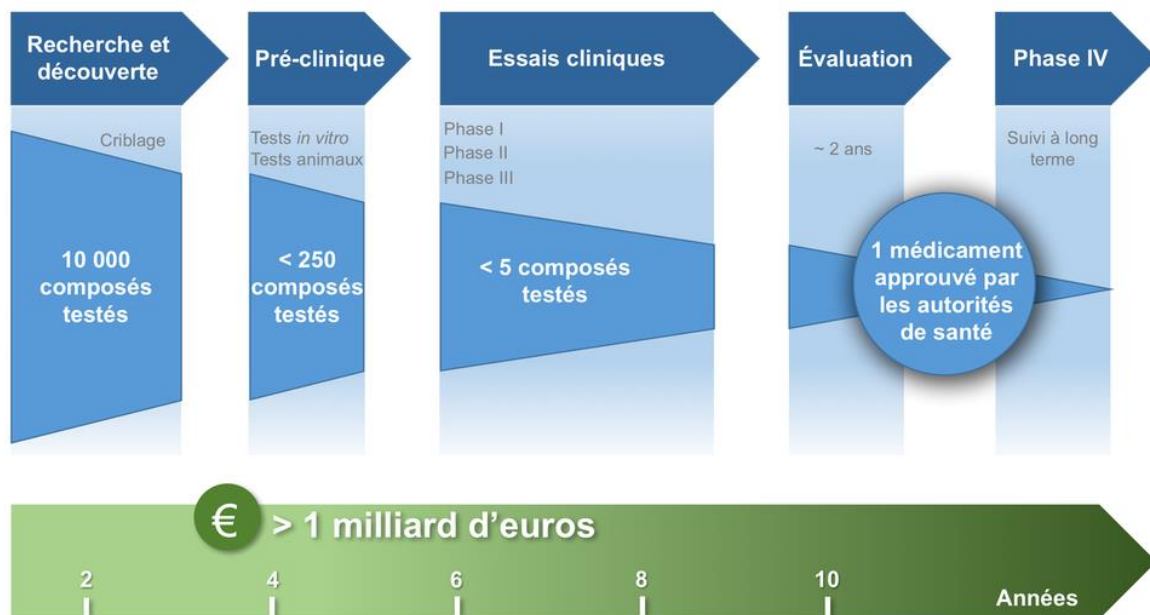


Figure 3 : La façon de découvrir et de développer de nouveaux médicaments connaît trois difficultés majeures : elle est trop coûteuse, prend beaucoup trop de temps et échoue plus souvent qu'elle ne réussit.

A ce stade, pour un médicament considéré, les entreprises pharmaceutiques ont dépensé en moyenne 2 milliards d'euros et 14 années se sont écoulées depuis le moment où la molécule candidate a été identifiée (Fig. 3). Etant donné que le brevet du médicament a également été déposé depuis plusieurs années, il n'est pas certain que l'entreprise puisse bénéficier d'un retour sur investissement suffisant avant la date d'expiration du brevet. Naturellement, il est de plus en plus compliqué de découvrir de nouvelles molécules efficaces (car les molécules d'une efficacité thérapeutique « faciles » à identifier l'ont déjà été), ainsi les entreprises pharmaceutiques dépensent de plus en plus d'argent pour des retours de moins en moins certains. Les chercheurs ont décrit ironiquement cette situation par une loi baptisée loi d'Eroom (Moore écrit à l'envers) stipulant que le développement d'un nouveau médicament est de plus en plus cher et de plus en plus long au fil du temps (Fig. 4).

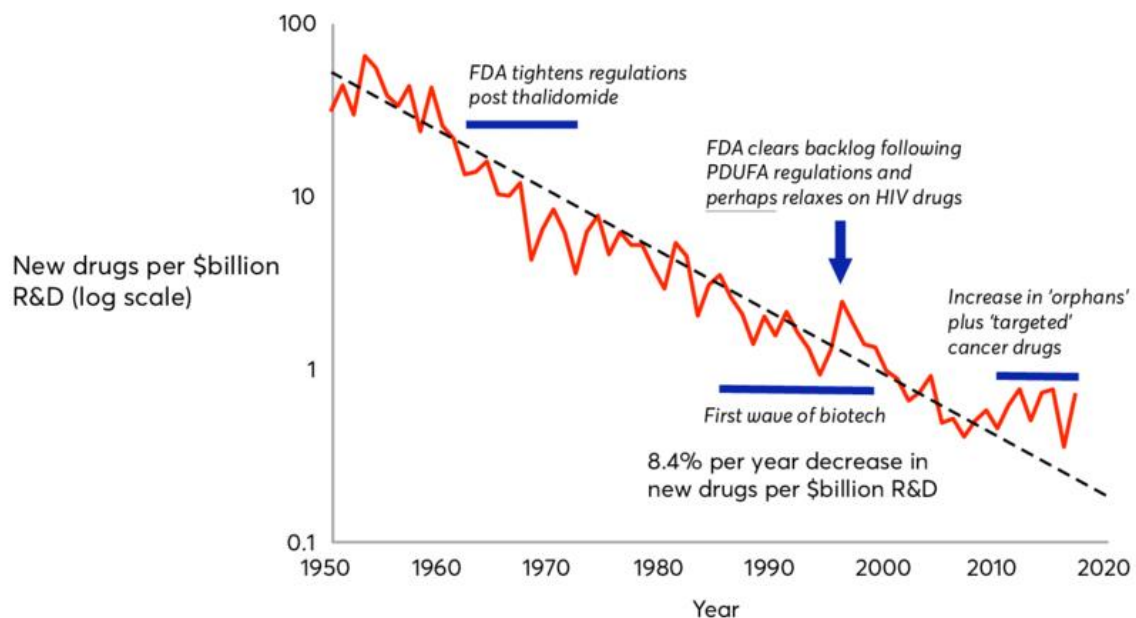


Figure 4 : Illustration de la diminution de l'efficacité de l'Industrie Pharmaceutique : tous les 9 ans, le nombre de médicaments approuvés par la FDA par milliard de dollars dépensé en R&D diminue de moitié. Cela signifie que des patients qui ont besoin de nouvelles thérapies pourraient ne pas les recevoir, et que des maladies risquent de ne pas être traitées.

2.2 Limites des modèles actuels

Au cours du développement de nouveaux médicaments, le processus peut échouer à différents moments, entraînant une perte considérable de temps et d'argent. Une cause importante de cet échec est que les modèles actuels ne sont pas toujours capables de rendre compte de la complexité physiologique des patients, ni des variations entre groupes de population. Devant cet état de fait, l'industrie pharmaceutique cherche à « échouer plus vite et moins cher » (« fail cheaper, fail faster ») pour réduire les coûts. Les organes-sur-puce, en détectant la toxicité de

certaines molécules sur les cellules humaines à un stade précoce, pourraient permettre de répondre à ce défi, mais offrent également des perspectives beaucoup plus larges.

Chacun des modèles couramment utilisés qui ont été décrits plus haut, souffre d'importantes limites. Les modèles *in vitro* classiques sont des modèles de test relativement bon marché qui peuvent être utilisés à grande échelle. Cependant, en réduisant la maladie à une simple succession d'étapes biochimiques, ils constituent souvent une simplification excessive de la réalité en vue d'une identification fiable de médicaments prometteurs. La réalité est que de nombreuses maladies résultent de la combinaison de plusieurs voies métaboliques, facteurs génétiques et environnementaux, de sorte qu'une substance avec un résultat positif dans un test peut n'avoir aucun effet chez le patient. Par des mécanismes similaires, il se peut à l'inverse qu'une molécule ne soit pas identifiée alors qu'elle aurait pu être un candidat prometteur pour un traitement.

L'utilisation d'animaux comme modèles est, quant à elle, beaucoup plus coûteuse et chronophage. Mais surtout, les animaux de laboratoire présentent une limite évidente : ils ne reflètent pas toujours avec précision la réponse des humains aux médicaments, car leur physiologie et leur bagage génétique sont sensiblement différents des nôtres. Cela signifie que des médicaments, qui peuvent être très efficaces dans un modèle de souris, n'auront aucun effet chez l'homme. Ainsi, même après avoir été validées sur des animaux (sûreté et efficacité), plus de 80% des thérapies échouent lorsqu'elles sont testées chez l'homme¹⁵.

En outre, le modèle animal comme modèle de maladie humaine pose parfois un problème si le gène humain n'est pas présent chez la souris ou si un agent pathogène pour l'homme n'est pas reconnu dans le corps de la souris. C'est le cas par exemple du coronavirus Sars-CoV-2, qui pénètre dans une cellule humaine par le biais du récepteur ACE2. Chez la souris contrairement à l'humain, le récepteur ACE2 ne se lie pas ou très peu au virus, ainsi les cellules de souris ne sont pas infectées et ne peuvent aider à la compréhension de la façon dont le virus Sars-CoV-2 affecte les humains. Autre exemple, le cœur d'une souris bat 500 fois par minute, alors que celui de l'homme environ 60 fois par minute. Il n'est ainsi pas surprenant de constater que les médicaments qui influencent le rythme cardiaque humain n'ont souvent aucun effet sur le cœur de la souris. En définitive, on estime que 80 à 90 % des médicaments prometteurs qui sont testés pour la première fois chez l'homme à la suite d'expériences sur les animaux échouent immédiatement en raison d'effets secondaires inattendus ou parce qu'ils n'ont aucun effet⁴. Bien que les expériences sur les animaux resteront nécessaires dans les sciences biomédicales (ne serait-ce que pour les études comportementales), les organes-sur-puce (en utilisant des cellules humaines) pourraient considérablement réduire l'utilisation d'animaux de laboratoire, qui, en plus de poser des problèmes éthiques, ne sont pas toujours de bons modèles pour prédire comment certaines maladies se manifesteront chez l'homme ou comment celui-ci réagira à tel ou tel médicament.

De ce qui précède découle naturellement l'idée que le meilleur modèle de test de médicaments pour l'humain est l'humain lui-même. En pratique, la réponse est moins évidente qu'il n'y

paraît. D'une part, seuls les molécules candidates présentant un risque minimal estimé pour la personne peuvent être testés chez l'homme, d'autre part ce risque n'est jamais nul (en 2015 en France par exemple, lors d'un essai clinique de phase I sur 90 sujets s'étant portés volontaires pour absorber la molécule BIA 10-2474, cinq patients développèrent des graves effets secondaires et l'un d'eux en mourut). De plus, les essais cliniques sont généralement menés sur des hommes blancs en bonne santé, qui ne sont pas représentatifs de la variation mondiale du bagage génétique, de l'âge, du sexe, ou d'autres facteurs environnementaux. Mettre en place des essais cliniques prenant en compte toute cette variabilité serait d'ailleurs pratiquement impossible. Enfin, toutes les études ne peuvent pas être menées sur des sujets humains, par exemple lorsqu'il s'agit d'examiner l'influence des radiations sur la santé. Pour toutes ces raisons, même un humain ne constitue pas un modèle parfait.

Tout cela justifie la nécessité actuelle de développer des modèles plus proches de la réalité physiologique du corps humain. C'est ainsi que sont apparus les organes-sur-puce.

3 Les organes-sur-puce

Le corps humain ne ressemble aucunement à une couche de cellules cultivées sur une surface plastique. Il est au contraire un ensemble tridimensionnel complexe fait de matériaux plus ou moins souples, constitué d'une multitude d'organes alimentés en nutriments et en oxygène par des vaisseaux sanguins dans lesquels s'écoulent sang et cellules à des débits qui influencent le comportement des cellules. Développer des organes-sur-puce, c'est prendre en compte ce microenvironnement 3D dynamique et essayer de le reproduire aussi fidèlement que possible dans une puce microfluidique embarquant différents types cellulaires, afin de mimer certaines fonctions spécifiques d'un organe.

3.1 Définition

Comme son nom le laisse deviner, un organe-sur-puce est composé de deux éléments essentiels : des cellules (l'organe) au sein d'un microenvironnement (la puce). La puce microfluidique est conçue de telle sorte que les cellules se comportent de manière aussi naturelle que possible et puissent simuler différentes fonctions du corps humain. Au contraire de la culture classique de cellules dans une boîte de Petri, les chercheurs peuvent ainsi offrir aux cellules le microenvironnement adéquat pour qu'elles se sentent « chez elles ». Pour reprendre l'expression du chercheur Donald Ingber du Wyss Institute (Université de Harvard), les développeurs d'organes-sur-puce sont des « architectes cellulaires » qui ont pour but de reproduire au mieux l'environnement dans lequel les cellules évoluent *in vivo*. L'idée sous-jacente est que si les cellules sont placées au plus proche de la façon dont elles se retrouvent dans le corps humain, au mieux elles constitueront un modèle capable de prédire ce qui se passe dans le corps humain en cas de maladie ou d'administration d'un médicament.

- ➔ Les cellules / « l'organe » : les cellules spécifiques d'un organe peuvent souvent être produites à partir de cellules souches pluripotentes (c'est avec ce type de cellules qu'ont été produits les organoïdes de vaisseaux sanguins qui seront étudiés au chapitre 3) ou adultes, mais des tissus primaires peuvent également être utilisés, comme des coupes de tissus provenant de biopsies de patients, ou des lignées cellulaires provenant de tumeurs spécifiques d'un organe qui se divisent continuellement. Chacun de ces différents types de cellules présente des avantages et des inconvénients, tels que la disponibilité, le bagage génétique et toute anomalie spécifique au patient. Les cellules peuvent être génétiquement modifiées, par exemple en leur permettant de produire un marqueur fluorescent, afin qu'il soit plus facile de suivre leur comportement dans la puce ; c'est le cas par exemple des cellules endothéliales HUVEC-GFP et HUVEC-RFP qui ont été largement utilisées dans le cadre de cette thèse.

- ➔ Le microenvironnement / « la puce » : la puce doit être conçue de manière à pouvoir imiter l'environnement naturel des cellules. Par exemple, lorsqu'il s'agit de former des vaisseaux sanguins sur puce afin de reproduire la vascularisation d'un tissu biologique donné, une boîte de Petri est particulièrement inadaptée. En effet, les cellules endothéliales ne peuvent former, sur une surface plane, des vaisseaux sanguins avec une structure de tube creux. En revanche, comme nous le verrons dans la suite de ce manuscrit, il suffit de leur offrir un environnement tridimensionnel de type hydrogel pour qu'elles s'y auto-organisent en un réseau de structures morphologiquement semblables à des vaisseaux sanguins tels qu'ils sont observés dans notre corps. Enfin, il existe un autre aspect jouant un rôle crucial dans le corps humain, rôle qu'il n'est pas possible de reproduire dans les systèmes *in vitro* statiques conventionnels : la circulation des fluides. Alors que le milieu de culture (sang de substitution) dans une boîte de Pétri est le plus souvent immobile, dans le corps, le sang circule en permanence. Il n'est ainsi pas surprenant que les cellules des vaisseaux sanguins se comportent plus naturellement lorsqu'elles sont exposées à un milieu circulant à un débit proche de celui que l'on retrouve dans notre corps. Pour permettre et contrôler ces aspects dynamiques, la microfluidique est essentielle.

Un exemple : un des premiers organes-sur-puce

Il est difficile de précisément dater le début des organes-sur-puce, mais l'idée consistant à imiter une fonction au niveau d'un organe en utilisant des cellules dans une puce microfluidique remonte au moins à 2004, avec par exemple une étude de l'équipe de Michael Shuler de l'Université Cornell, dans laquelle les auteurs rapportent l'interaction entre des cellules de poumon et de foie dans une puce microfluidique en silicium, avec notamment des débits choisis pour reproduire les cisaillements mesurés dans les organes *in vivo*. L'idée était d'associer ce modèle *in vitro* avec un modèle mathématique pharmacocinétique de façon à apporter un complément aux expérimentations animales. S'ensuit dans les années 2000, une série de

dispositifs microfluidiques imitant diverses fonctions biologiques et diverses maladies, en cultivant des cellules provenant de muscles, d'os, de foie, d'intestin ou encore de rein.

En 2010, le groupe du professeur Donald Ingber au Wyss Institute for Biologically Inspired Engineering de l'Université de Harvard publie un article dans Science. Dongeun Huh et ses collègues présentent un système microfluidique dans lequel sont cultivées des cellules pulmonaires sur une membrane poreuse. La véritable originalité de cette étude réside dans l'implémentation de deux canaux microfluidiques latéraux pressurisés afin de mimer le mouvement des poumons associé à la respiration (Fig. 5) : le mot d'organe-sur-puce est ainsi utilisé pour la première fois. Ce modèle permettra d'étudier avec succès un large éventail de maladies, de l'infection bactérienne à la Covid-19 en passant par l'œdème pulmonaire.

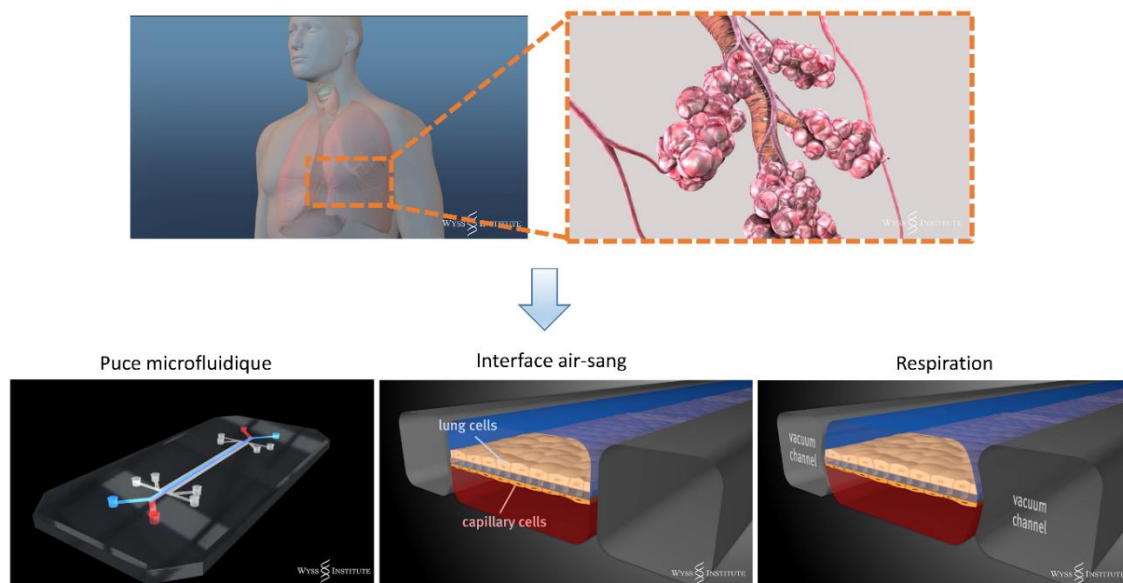


Figure 5 : De l'organe à l'organe-sur-puce. Tiré d'une vidéo de présentation du Wyss Institute.

3.2 Observation du dispositif microfluidique

La valeur de tout système modèle, et donc aussi des modèles d'organes-sur-puce, est déterminée par la richesse de l'information que l'on peut en extraire. Grâce à l'intégration de différents types de capteurs au sein des puces microfluidiques, de multiples paramètres comme le niveau d'oxygène, le pH ou la viabilité des cellules, peuvent être mesurés. Cependant, comme nous le verrons plus en détail en deuxième partie de ce chapitre, d'importants efforts restent à faire dans ce domaine. A l'heure actuelle, le suivi de la grande majorité des organes-sur-puce se fait par l'observation des puces au microscope.

D'abord, il est possible d'observer en temps réel ce qu'il se passe dans la puce en l'observant à l'aide d'un microscope classique. Comme précédemment évoqué, pour une meilleure visualisation, on utilise souvent des cellules fluorescentes. En fin d'expérience, on peut également fixer les tissus au sein de la puce et réaliser un immunomarquage (immunostaining en anglais), technique de biologie cellulaire permettant de révéler par fluorescence la localisation de protéines spécifiques (c'est cette technique qui a été utilisée au Chapitre 3 avec

la protéine CD31 dans les organoïdes de vaisseaux sanguins, pour révéler la présence de cellules endothéliales). Couplée aux techniques de microscopie confocale, qui permettent désormais d'observer les tissus ainsi fixés et colorés avec une grande précision, cette approche devient particulièrement intéressante. L'inconvénient est que cette analyse ne peut être effectuée qu'une seule fois en fin d'expérience, car la fixation et la coloration sont irréversibles.

3.3 Potentiel pour l'industrie

Comme nous l'avons déjà évoqué, le modèle de développement des industries pharmaceutiques à travers la découverte de nouveaux médicaments est un modèle du passé qui fonctionne de plus en plus mal. Bien que la difficulté grandissante de développer de nouveaux médicaments puisse être vue a priori comme une actualité peu réjouissante, de cet état de fait naît aussi un regain d'intérêt de l'industrie pharmaceutique pour les biotechnologies de pointe. Grâce aux organes-sur-puce, le processus de développement de nouveaux médicaments pourrait être accéléré et moins coûteux. Mais le spectre d'action de cette technologie encore naissante est bien plus large : des patients atteints de cancer pourraient recevoir un traitement adapté à leur profil génétique, des femmes enceintes pourraient prendre un médicament donné sans craindre d'effets secondaires pour leur fœtus, des instituts de santé publique pourraient mieux surveiller les substances nocives dans l'eau potable.

Il reste toutefois de grands défis à relever en matière d'automatisation, de standardisation des systèmes et de facilité d'utilisation, qui sont cruciaux pour la mise en œuvre de la technologie dans un cadre industriel. Une des contraintes majeures pour une adoption plus large des organes-sur-puce dans le milieu industriel réside dans le choix des matériaux. Plus précisément, les matériaux utilisés pour concevoir les puces microfluidiques doivent répondre à trois contraintes principales. D'abord, ils doivent être biocompatibles, c'est-à-dire qu'ils ne doivent pas avoir d'effet toxique sur les cellules et les tissus ; ensuite, ils doivent être optiquement transparents afin de permettre l'observation des cellules au microscope ; enfin, ils doivent être compatibles avec des procédés de fabrication à grande échelle en vue d'une industrialisation.

Les puces en PDMS :

Le polydiméthylsiloxane (PDMS) est le matériau le plus utilisé dans la recherche en microfluidique et dans le domaine des organes-sur-puce en particulier. Ce matériau optiquement transparent et biocompatible est par ailleurs relativement flexible de sorte qu'il peut être actionné mécaniquement, et perméable à l'oxygène, ce qui lui confère un avantage important pour la culture cellulaire. Enfin, différentes géométries tridimensionnelles complexes peuvent être réalisées avec une grande précision par un simple processus de moulage. Pour toutes ces raisons, le PDMS est un matériau privilégié, en particulier dans la phase de recherche du développement de la puce, pour concevoir et tester rapidement des prototypes d'organes sur puce. Cependant, le PDMS présente des inconvénients qui le rendent

difficile à industrialiser. Ce matériau absorbe en effet les petites molécules, y compris les médicaments potentiels, d'une manière non spécifique et difficile à prévoir. C'est un problème pour son utilisation dans le développement de médicaments, car il est très difficile de déterminer exactement la concentration d'un médicament à laquelle les cellules seront exposées. De plus, le temps de cycle de fabrication des puces en PDMS reste très long par rapport aux autres techniques de répliquions à grandes échelles ; ainsi une production rentable de puces est difficile à réaliser. En définitive, le PDMS reste un matériau de choix pour la recherche académique, mais d'autres matériaux doivent être utilisés dès lors que le critère d'industrialisation entre en ligne de compte.

Les puces en plastique :

De nombreux types de plastiques peuvent être utilisés. Par exemple, les plastiques comme le polystyrène, le PMMA (poly(méthacrylate de méthyle) ou le COC (cyclolefin copolymer) conviennent à la culture cellulaire et sont optiquement transparents. En outre, ces matériaux peuvent être produits à grande échelle par des procédés industriels tels que le moulage par injection (hot embossing en anglais) ou le fraisage de précision (precision milling en anglais). Dans le cadre de cette thèse effectuée au CEA-Leti, qui se positionne entre la recherche et l'industrie, ce contexte a été pris en compte. Le laboratoire accorde une attention particulière à sélectionner des technologies facilement industrialisables ou transférables à des entreprises, afin de ne pas avoir à redévelopper les technologies entre les phases de recherche et d'industrialisation. Ainsi, toutes les puces microfluidiques présentées dans ce manuscrit ont été réalisées en COC, et les microcanaux usinés par fraisage de précision. Par rapport au PDMS, le COC présente par ailleurs d'autres avantages : une auto-fluorescence moindre, une meilleure résistance aux solvants organiques, aux acides et aux bases, une plus grande stabilité dans le temps et une plus grande capacité d'intégration de capteurs électroniques.

4 Les organoïdes et les organoïdes-sur-puce

Afin de pallier les carences des paradigmes existants dans le développement de médicaments et dans la recherche en biologie, qui notamment échouent à reproduire les fonctions des organes humains en s'appuyant sur des systèmes modèles pertinents, de nombreuses études récentes se sont concentrées sur l'utilisation d'organoïdes. Les organoïdes sont des amas de cellules tridimensionnelles qui ont été étudiés en parallèle des organes-sur-puce, *a priori* sans lien direct avec ces derniers. Les organoïdes constituent en soi d'excellents modèles pour la recherche de nouveaux médicaments et l'étude de certaines maladies. Bien qu'il n'existe pas encore de définition stricte de ce qu'est un organoïde, un consensus scientifique s'accorde à lui attribuer les quelques traits suivants. C'est une structure :

- 1) **tridimensionnelle** et **multicellulaire**,
- 2) produite à partir de **cellules souches**,

- 3) capable de **s'auto-organiser** pour recréer la morphologie propre à l'organe,
- 4) avec une **ressemblance fonctionnelle** au moins partielle avec l'organe mimé.

Ces structures (pas nécessairement sphériques) généralement de taille millimétrique intègrent ainsi une grande complexité biologique et présentent plusieurs avantages par rapport aux approches existantes. Ce qui en fait des modèles remarquables, c'est leur capacité à reproduire la morphologie et l'organisation cellulaire *in vivo* à plus petite échelle, tout en présentant des caractéristiques génétiques très similaires à celles du tissu d'origine. Ces organoïdes se développent généralement dans une matrice extracellulaire naturelle qui fournit le support structurel nécessaire à l'organisation des cellules. En fournissant les repères biochimiques et physiques appropriés, il est désormais possible de cultiver de nombreux types d'organoïdes différents, notamment d'intestins¹⁶, de reins¹⁷, de cerveau⁶, de poumon¹⁸, de vaisseaux sanguins¹⁹, de cœur²⁰ etc. La fabrication d'organoïdes à partir de patients ouvre également des perspectives intéressantes pour la médecine personnalisée.

Si le principal avantage des organoïdes réside dans leur capacité à reproduire des structures 3D complexes et des fonctionnalités des organes qu'ils miment, cette approche reste limitée par l'absence d'accès direct à ces tissus *via* une vascularisation fonctionnelle. Les organoïdes sont en effet généralement cultivés dans des plaques à puits, c'est-à-dire dans des environnements éloignés de la réalité physiologique du corps humain. Alors que dans le corps humain, les organes sont alimentés et connectés au reste du corps grâce à un système vasculaire omniprésent, la grande majorité des systèmes d'organoïdes omettent totalement cet aspect. Pourtant, en l'absence de système vasculaire, certains processus biologiques tels que le recrutement des cellules immunitaires lors d'une inflammation tissulaire, ne peuvent être reproduits et étudiés de façon adéquate. Si certaines études ont montré qu'il était possible de générer des organoïdes intégrant une vascularisation en leur sein^{20,21}, celle-là ne peut généralement pas être perfusée de manière fonctionnelle. Or, il a été montré que la perfusion intravasculaire est essentielle à la stabilisation des vaisseaux et que l'absence de perfusion pourrait entraîner la régression des vaisseaux²². Par conséquent, l'implémentation d'une vascularisation et d'une perfusion intravasculaire fonctionnelle est cruciale. Certaines stratégies de vascularisation fonctionnelle d'organoïdes par implantation animale ont conduit à des résultats remarquables^{19,23-25}, mais elles ne possèdent pas les avantages de simplicité et d'adaptabilité des applications *in vitro*.

Ainsi, très récemment, certains groupes de recherche ont vu l'intérêt de réunir les organoïdes au sein de systèmes microfluidiques de sorte à établir des organoïdes-sur-puce vascularisés, combinant la complexité biologique des premiers avec les avantages intrinsèques du second. Par exemple, des chercheurs ont mis au point un système microfluidique pour étudier des organoïdes rénaux vascularisés²⁶ (Fig. 6). Les auteurs ont montré que plus les organoïdes étaient soumis à un fort écoulement, plus leur système vasculaire était développé. Cependant, l'écoulement généré dans cette puce microfluidique se fait au-dessus des organoïdes et non pas par une perfusion intravasculaire, ce qui limite la capacité du dispositif à sonder l'espace

intravasculaire des organoïdes. Le défi visant à apporter une vascularisation fonctionnelle aux organoïdes *via* un modèle *in vitro* demeure donc à ce jour entier.

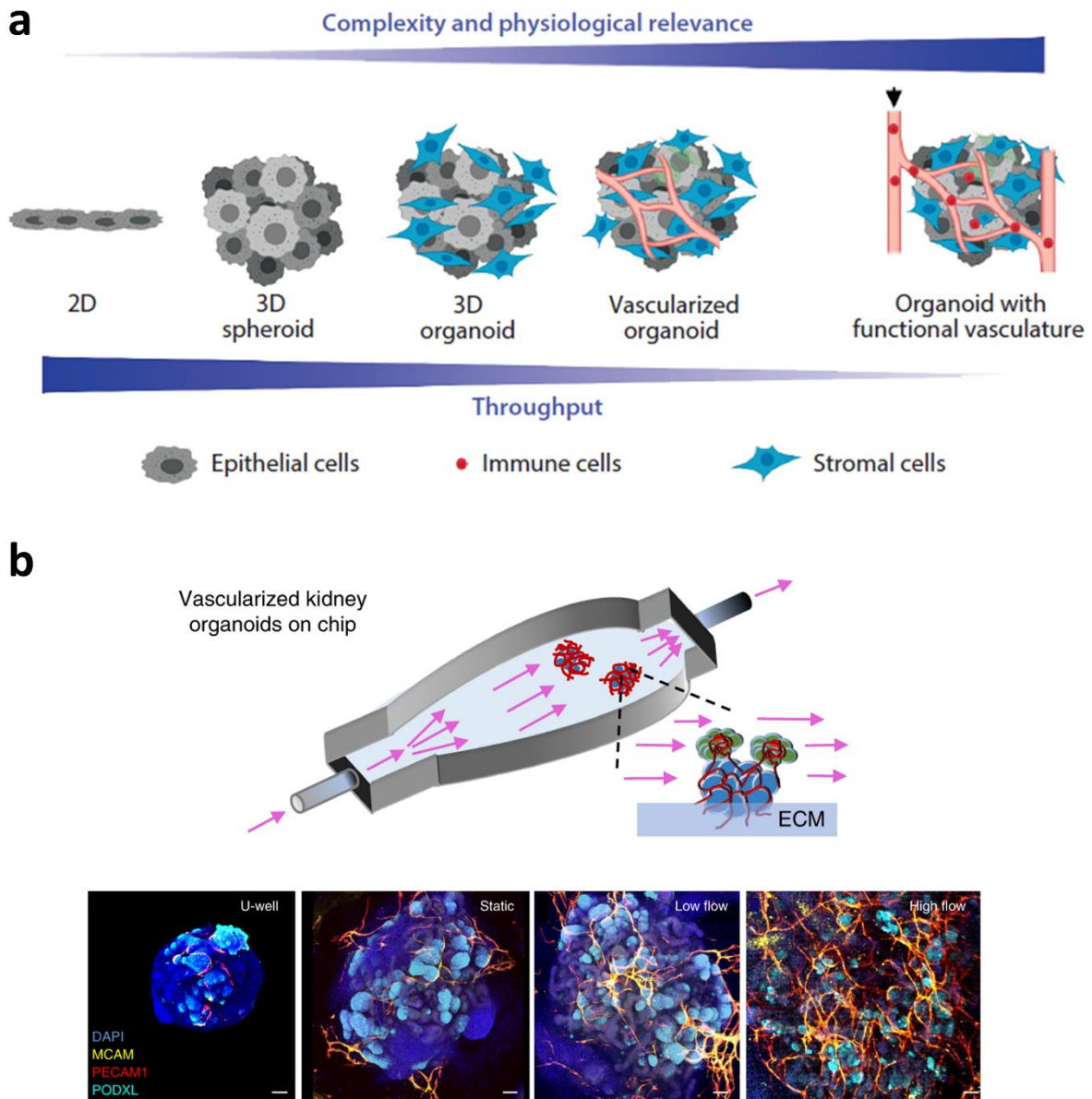


Figure 6 : **a.** Différents degrés de sophistication de cultures cellulaires sont associés à différents rendements. Tiré de Shirure et al.²⁷, **b.** Système microfluidique pour la perfusion d'organoïdes de rein sur puce (en bleu). L'écoulement généré dans la puce améliore la vascularisation au sein de l'organoïde (en jaune orangé). Tiré de Homan et al.²⁶.

Il existe plusieurs stratégies visant à implémenter une vascularisation sur puce microfluidique. Depuis une dizaine d'années, de nombreux groupes de recherche ont développé différentes approches pour établir des réseaux vasculaires sur puce. La deuxième partie de ce chapitre se propose d'analyser plus en détail ces travaux, en portant une attention particulière sur le rôle que la microfluidique peut jouer dans l'élaboration et le fonctionnement de ces systèmes.

Partie 2 : Réseaux microvasculaires sur puce : vers une facilité d'utilisation des dispositifs microfluidiques et des organoïdes vascularisés sur puce

1 Introduction

De nombreuses études ont mis en évidence les avantages uniques de la microfluidique, tels que sa robustesse, ses capacités de multiplexage, ses faibles coûts de fabrication et de maintenance, sa capacité de contrôler avec précision de petits volumes de liquide et le microenvironnement cellulaire²⁸. En particulier, le domaine des organes-sur-puce (OoC pour Organ-on-Chip en anglais) est né de la nécessité de créer de meilleurs modèles biologiques, pour des raisons scientifiques, financières et éthiques. L'expérimentation animale, bien que vitale pour les phases précliniques dans le processus de développement de nouveaux médicaments, reflète souvent mal l'efficacité et la toxicité d'un médicament donné chez l'homme. Ainsi, plus de 80% des médicaments candidats qui ont passé avec succès les tests sur les animaux échouent par la suite dans les essais cliniques¹⁵. Les questions éthiques conduisent actuellement à de plus en plus de réglementations contraignantes pour les industries pharmaceutique et cosmétique. Par exemple, l'expérimentation animale pour le développement de produits cosmétiques est interdite dans l'Union européenne depuis 2013. De même, le 20 septembre 2021, le Parlement européen a adopté une résolution visant à mettre fin à l'expérimentation animale. Il est ainsi demandé à la Commission européenne de développer un plan d'action pour mettre fin à toutes les expérimentations sur les animaux. De toute évidence, les modèles animaux sont également problématiques pour la visualisation de processus biologiques dynamiques tels que la vasculogenèse. Les OoC sont également apparus pour surmonter les nombreuses limitations des cultures statiques conventionnelles en 2D dans des boîtes de Petri. Les techniques microfluidiques permettent de fabriquer avec précision des géométries sur-mesure, afin de créer des cultures cellulaires 3D contrôlées dans l'espace, auxquelles on peut appliquer des gradients biochimiques, des écoulements dynamiques et des forces biomécaniques. Les techniques de manipulation des liquides peuvent assurer une perfusion continue des tissus biologiques et reproduire des stimuli mécaniques *in vivo* tels que la contrainte de cisaillement et le flux interstitiel, qui jouent un rôle clé dans le processus d'angiogenèse notamment. L'ensemble de ces avantages fait de la technologie OoC une excellente opportunité pour créer des modèles plus pertinents sur le plan physiologique. Les OoC pourraient non seulement fournir de bons modèles pour la biologie fondamentale, mais aussi améliorer le développement des médicaments et jouer un rôle clé dans la médecine personnalisée²⁹. L'intégration des OoC dans le processus de développement des médicaments

pourrait par ailleurs réduire considérablement les coûts et raccourcir les délais des phases précliniques³⁰.

Récemment, de nombreux efforts ont été déployés pour développer des réseaux vasculaires *in vitro*, que ce soit pour étudier le tissu en tant que tel, ou pour créer de nouveaux modèles de sphéroïdes^{31,32}, de tumoroïdes^{33,34} ou d'organoïdes³⁵ vascularisés plus pertinents sur le plan physiologique. Ces réalisations pourraient contribuer à l'étude de divers sujets tels que l'amélioration de la durée de vie des organoïdes grâce à la vascularisation, la circulation et le devenir des cellules immunitaires dans les organoïdes, l'exposition à des médicaments, des acides nucléiques ou des stress métaboliques. Des modèles de la barrière hémato-encéphalique sur puce ont également été proposés, en co-cultivant des cellules endothéliales avec des pericytes et des astrocytes, à la fois pour développer de nouveaux modèles de maladies, et pour étudier la perméabilité des vaisseaux aux molécules de différentes tailles³⁶⁻⁴⁰. Ainsi, cette classe particulière d'OoC, que nous appellerons **réseaux microvasculaires (MVN** pour **Microvascular Networks** en anglais) dans la suite, a contribué de manière significative à notre compréhension de la façon dont les vaisseaux sanguins se développent et répondent à une myriade de signaux biochimiques et mécaniques. Notons que l'appellation « réseaux microvasculaires » est quelque peu abusive, étant donné que plusieurs types de cellules et caractéristiques importantes des réseaux vasculaires *in vivo* (pericytes, cellules musculaires lisses, membranes basales, etc.) sont absents de ces derniers. Les réseaux que nous allons analyser consistent pour la plupart simplement en un assemblage de cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine (HUVEC) et de cellules support type fibroblastes de poumon, et devraient ainsi plutôt être qualifiés de « réseaux endothéliaux ». Par souci de cohérence avec le domaine, dans lequel la dénomination de « microvascular networks on-chip » et de l'acronyme associé « MVN » est déjà largement utilisé, nous utiliserons également ces termes.

Les cellules endothéliales, qui constituent la surface interne de tous les vaisseaux, sont constamment affectées par les forces hémodynamiques⁴¹ ; il est dès lors crucial d'incorporer les flux physiologiques dans les dispositifs de MVN-sur-puce. Par conséquent, des efforts conjoints entre les experts de la microfluidique et les biologistes sont nécessaires pour fournir aux cellules un microenvironnement adapté, et ce de façon contrôlée. Ici, nous passons en revue plus d'une centaine d'articles traitant des tissus vascularisés sur puce. Nous examinons, d'un point de vue technologique, comment les chercheurs ont choisi de concevoir leurs systèmes et de réaliser leurs expériences, de l'ensemencement des cellules dans les puces microfluidiques jusqu'à l'analyse des sécrétions des tissus étudiés. Les graphiques circulaires (Tableau 1) présentent un bref résumé des choix effectués dans les articles examinés, sur lesquels nous reviendrons plus en détail au fil de ce chapitre. Cette synthèse bibliographique donne une photographie complète des dispositifs de MVN-sur-puce qui ont été développés durant la dernière décennie au moins, une analyse des solutions technologiques retenues (architecture microfluidique, matériaux pour la fabrication, nature des cellules et des hydrogels, génération des écoulements, etc.) et du potentiel futur de ces systèmes.

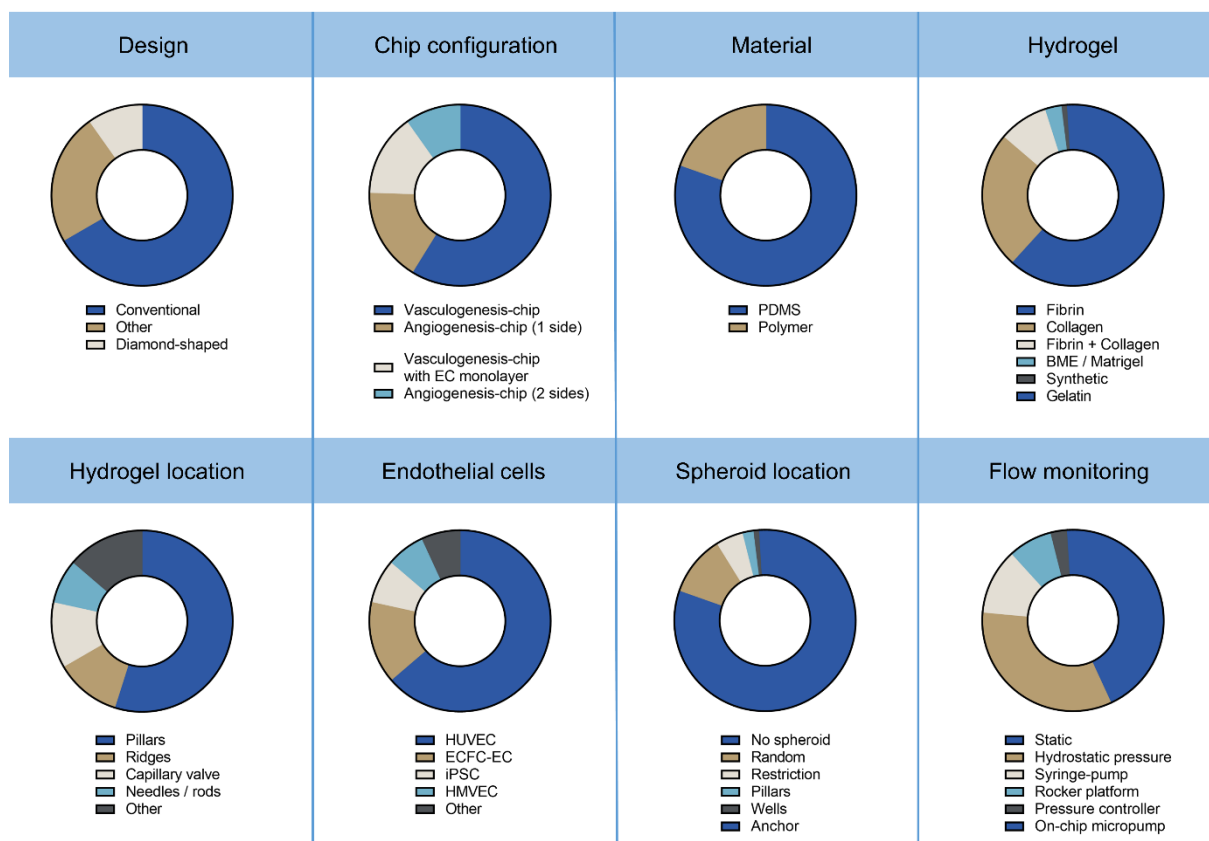


Tableau 1 : Tableau récapitulatif montrant une vue générale des stratégies suivies dans la centaine d'articles relatifs aux MVN-sur-puce analysés ici, suivant différents paramètres.

2 Développer des réseaux microvasculaires *in vitro*

Avec le développement des techniques de fabrication, les dispositifs microfluidiques peuvent être conçus de manière flexible avec une résolution adaptée à l'échelle de la biologie, et offrent de nombreux avantages en combinant aspects dynamiques, faible consommation de réactifs et facilité d'observation. Par conséquent, les systèmes microfluidiques ont fait des percées importantes dans la recherche biologique conventionnelle. En particulier, ces systèmes microfluidiques ont été largement utilisés pour étudier le développement des processus de vascularisation. Ces dispositifs microfluidiques sont pour la plupart basés sur un même design général, comprenant une microchambre centrale bordée par deux canaux latéraux. La microchambre principale est remplie d'un hydrogel imitant la matrice extracellulaire *in vivo* et permettant le support des réseaux microvasculaires induits dans ces études. Les canaux latéraux sont les canaux de perfusion, qui fournissent aux cellules les nutriments et l'oxygène nécessaires à leur bon développement.

Les réseaux vasculaires *in vitro* peuvent être générés par deux approches distinctes : grâce à la culture de cellules endothéliales dans des puces microfluidiques présentant des motifs prédéfinis (approche « patterning »), ou par l'auto-assemblage des cellules endothéliales en réseaux (approche « self-assembly »). Ici, nous nous concentrerons uniquement sur les réseaux

auto-assemblés, d'une part car l'approche « patterning » repose sur des systèmes microphysiologiques très différents, d'autre part car l'approche d'auto-organisation des cellules offre l'avantage majeur de reproduire avec précision les processus à l'œuvre *in vivo*.

2.1 Architecture microfluidique

La plupart des articles analysés (67%) présentent une architecture microfluidique très générale, où la microchambre centrale est séparée des canaux latéraux par des murets ou des piliers (Fig. 1A i). Conçues et espacées de manière appropriée, ces microstructures permettent, par des effets de capillarité, de confiner la phase d'hydrogel dans la chambre centrale pendant les étapes de mise en culture. À partir de cette architecture générale, de nombreuses variations peuvent être faites pour répondre à des besoins spécifiques. Un design légèrement différent et couramment utilisé (10%), a été introduit par les groupes de C.C.W. Hughes et S.C. George, et est constitué de microchambres en forme de losange reliées aux canaux latéraux par des pores étroits (Fig. 1A ii). Dans ce cas, la chambre gélifiée n'est pas bordée tout du long par les canaux latéraux, mais reliée à ceux-ci par des pores qui agissent comme des valves capillaires pour éviter que la solution d'hydrogel ne fuite dans les canaux de perfusion lors de l'ensemencement des puces microfluidiques. D'autres conceptions très diverses existent, comprenant des microstructures servant de guides pour le développement des vaisseaux endothéliaux⁴², des chambres hexagonales⁴³ ou des dispositifs multicouches intégrant une membrane poreuse^{29,44}, parmi de nombreuses autres possibilités.

Deux approches principales peuvent être utilisées pour induire le développement d'un réseau endothélial auto-organisé dans l'hydrogel. Dans la plupart des études, les cellules endothéliales ainsi que les cellules support sont incorporées dans le gel avant les étapes de mise en culture. Cela conduit à des « puces **vasculogénèse** » (75 % des articles examinés) (Fig. 1B), où les cellules endothéliales s'organisent d'elles-mêmes en réseaux tridimensionnels au sein d'une matrice homogène⁴⁵. Les puces peuvent êtreensemencées avec différents types d'hydrogels. Les cellules s'auto-assemblent en réseaux endothéliaux fonctionnels en quelques jours de culture. En suivant cette approche, de nombreux groupes ont apporté des contributions importantes à la compréhension des MVN.

Précurseurs, Whisler et al.⁴⁶ ont étudié dès 2012 les rôles de différents paramètres clés tels que la concentration de fibrine ou la densité d'ensemencement des cellules sur l'aspect morphologique des réseaux endothéliaux ainsi formés. Kim et al.⁴⁷ ont également, en 2013, établi les premiers MVN fonctionnels *in vitro*, récapitulant à la fois les processus de vasculogénèse et d'angiogénèse. Depuis, plusieurs équipes de recherche ont développé des réseaux vasculaires fonctionnels sur puce. La fonctionnalité des réseaux est généralement évaluée par la perfusion des réseaux par des billes fluorescentes ou des colorants, tandis que leur morphologie peut être observée par imagerie confocale, de sorte à mettre en évidence l'existence de structures de type vaisseau, c'est-à-dire présentant des lumières creuses. Les « puces vasculogénèse » ont été utilisées pour modéliser des phénomènes aussi divers que la

vascularisation des tumeurs⁴⁸⁻⁵⁰, l'extravasation des cellules cancéreuses⁵¹⁻⁵⁶, l'hypoxie^{57,58}, l'exposition des tissus à des agents chimiothérapeutiques⁵⁹, l'influence d'une supplémentation en VEGF (pour facteur de croissance de l'endothélium vasculaire, vascular endothelial growth factor en anglais)⁶⁰ ou encore l'effet des particules fines ambiantes⁶¹. Récemment, Haase et al.³³ ou Yang et al.⁶² ont apporté une complexité biologique en incorporant plusieurs types cellulaires supplémentaires dans les MVN-sur-puce, tels que des pericytes et des adipocytes, pour étudier des interactions encore mal comprises. De plus, pour assurer des connexions fonctionnelles entre les MVN et les canaux de perfusion mimant veines et artères, des cellules endothéliales peuvent également êtreensemencées dans des canaux latéraux^{37,39,44,63-74} (Fig. 1B2). En utilisant cette méthode, Wang et al.⁶³ ont réussi à connecter les MVN des chambres centrales en losange avec les canaux latéraux tapissés de cellules endothéliales (Fig. 1B2 i). Si les auteurs ont démontré que l'ajout d'un tel tapis endothélial favorisait une meilleure connexion entre les réseaux vasculaires et les canaux latéraux, ils ont reconnu que cela rendait également l'ensemble du protocole expérimental plus complexe et plus difficile à mettre en œuvre. Campisi et al.³⁷ ont égalementensemencé des cellules endothéliales (en l'occurrence dérivées de cellules souches pluripotentes induites, iPSC-EC) dans des canaux latéraux pour modéliser la barrière hémato-encéphalique humaine (Fig. 1B2 ii). Les auteurs ont montré que la monocouche de cellules endothéliales ainsi formée contre le gel améliorerait la perfusabilité des MVN.

Dans d'autres études, les cellules endothéliales sontensemencées dans un (Fig. 1C1) ou dans les deux (Fig. 1C2) canaux latéraux. Elles adhèrent alors aux parois formées par l'hydrogel. Cela conduit à des « puces **angiogénèse** » (25 % des articles examinés) (Fig. 1C), un processus dans lequel de nouveaux vaisseaux se développent à partir de vaisseaux préexistants⁷⁵. Dans ces puces, les bourgeonnements des cellules endothéliales sont initiés à partir de monocouches endothélialesensemencées à la surface de l'hydrogel. Le réseau se développe ainsi depuis les canaux latéraux vers l'hydrogel dans lequel pénètrent les cellules endothéliales, attirées soit par les cellules tumorales de la microchambre centrale, soit par un gradient de facteurs angiogéniques induit par les expérimentateurs. De nombreux systèmes microfluidiques ont permis d'étudier ce processus d'angiogénèse sous différents angles. Plusieurs groupes de recherche ont cherché à comprendre les forces motrices de la migration et de l'organisation des cellules endothéliales au cours du processus d'angiogénèse, en concevant des puces microfluidiques permettant de délivrer un gradient de VEGF de manière contrôlée^{70,76-82}. Grâce à ces techniques, des « essais angiogéniques » peuvent être réalisés pour comparer l'efficacité de différents composés anti-angiogéniques (par exemple pour lutter contre le recrutement de vaisseaux sanguins dans les tumeurs)⁸³⁻⁸⁵. À partir d'une monocouche initiale dans un canal de perfusion latéral, les cellules endothéliales peuvent se différencier et envahir la microchambre centrale. Nguyen et al.⁷⁰ ont réussi dès 2013 à induire un MVN de cette manière, et ont observé quelques bourgeonnements issus du canal parent, et parvenant jusqu'au canal source opposé (fortement concentré en VEGF de façon à induire les bourgeonnement depuis le canal parent) avec des lumières fonctionnelles et perfusables, comme confirmé par la perfusion de microbilles fluorescentes (Fig. 1C1 ii). En ensemencant des cellules endothéliales des deux

côtés de la microchambre gélifiée, il a également été démontré que les vaisseaux pouvaient se rejoindre et s'anastomoser, reliant ainsi les canaux latéraux entre eux⁸⁶. En outre, des sphéroïdes peuvent être incorporés dans l'hydrogel pour élaborer des modèles de sphéroïdes vascularisés sur puce. Nashimoto et al.^{31,87} ont développé avec succès des sphéroïdes vascularisés par des réseaux perfusables (Fig. 1C2 i). Les facteurs angiogéniques sécrétés par le sphéroïde ont attiré les cellules endothéliales depuis les deux canaux latéraux, vers la microchambre centrale, jusqu'à ce qu'elles se rejoignent et fusionnent dans cette région, conduisant à un réseau microvasculaire entièrement fonctionnel connectant des sphéroïdes pré-vascularisés.

Grâce à ces deux approches (vasculogénèse et angiogénèse), l'intérêt de modéliser les mécanismes régissant les processus de vasculogénèse ou d'angiogénèse dans des dispositifs microfluidiques a été clairement établi. Ces MVN auto-organisés possèdent généralement nombre de marqueurs morphologiques, biochimiques et fonctionnels caractéristiques des vaisseaux sanguins *in vivo*. Bien que plusieurs types de cellules ou caractéristiques puissent manquer dans ces réseaux, ces modèles restent extrêmement utiles et prometteurs pour l'élaboration de modèles de maladies vasculaires, pour l'observation de phénomènes biologiques complexes ou encore pour le criblage de médicaments. Cependant, l'ensemencement et la culture à long terme de ces puces microfluidiques peuvent être difficiles et nécessitent souvent des réglages techniques complexes ou des opérations manuelles délicates. De l'introduction des différentes phases liquides dans la puce, jusqu'à la collecte des sécrétions cellulaires, de nombreuses manipulations microfluidiques sont demandées. Nous proposons ici d'examiner comment les différents groupes de recherche dans le domaine ont mis en œuvre ces fonctionnalités dans leurs travaux, et comment cela pourrait être amélioré afin de faciliter l'utilisation des OoC.

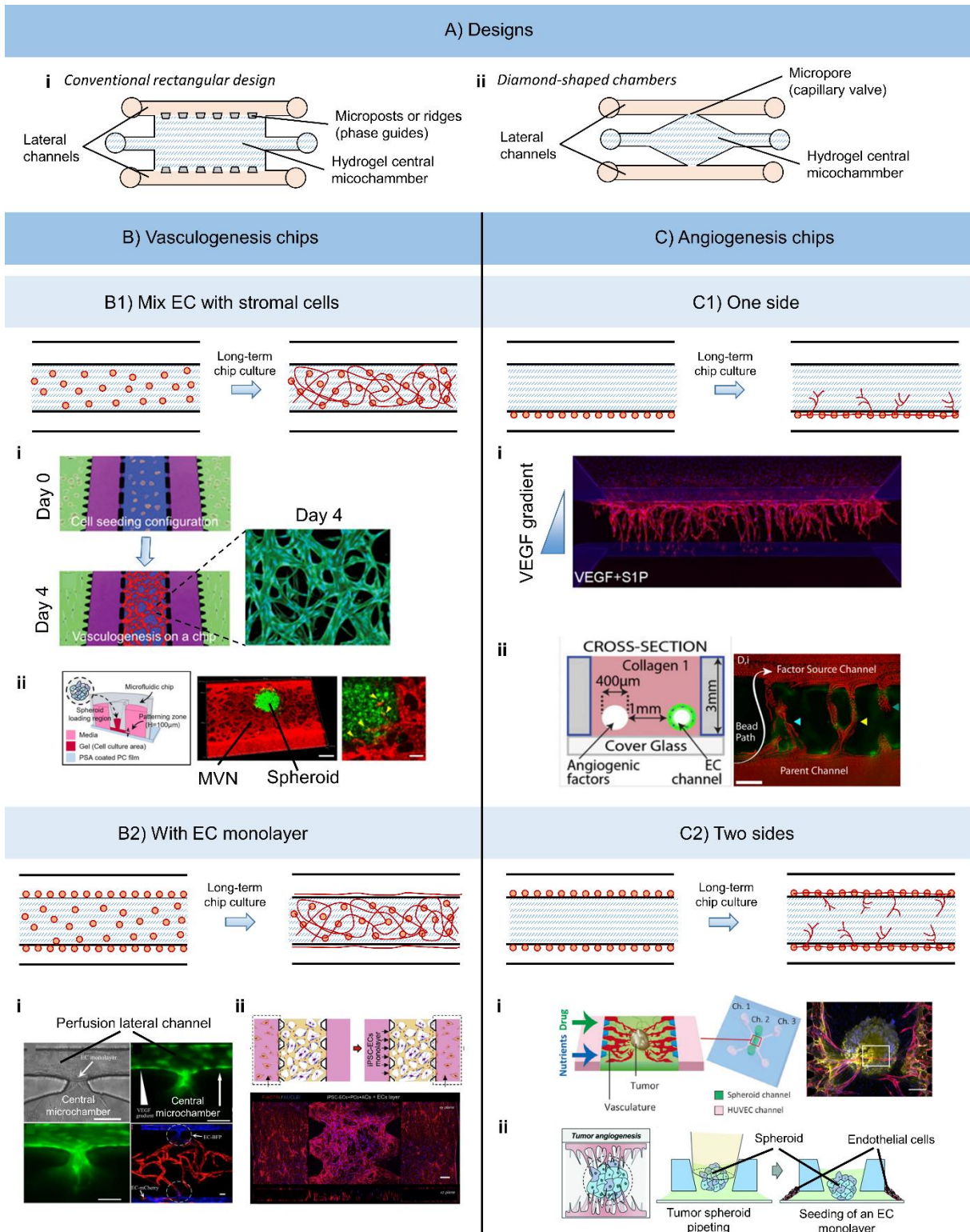


Figure 1 : Résumé des différentes configurations possibles dans les dispositifs de MVN-sur-puce, tirées de la littérature scientifique : B1i, B1ii.

2.2 Nature des cellules et mise en culture

Comme nous l'avons vu précédemment, les MVN-sur-puce sont créés par l'auto-assemblage de cellules à partir d'une distribution spatiale initiale aléatoire et homogène dans une chambre

gélifiée (puces vasculogénèse), ou par la pénétration de cellules depuis le canal microfluidique adjacent vers la chambre gélifiée (puces angiogénèse). Pour assurer la stabilité des réseaux microvasculaires, des cellules support sont co-cultivées avec les cellules endothéliales pour faciliter la formation de structures stables dans le temps, semblables à des capillaires sanguins⁸⁸. Si les fibroblastes sont presque toujours choisis comme cellules support, le choix du type des cellules endothéliales ensemencées mérite une attention particulière.

Dans une grande majorité des articles examinés (65%), des cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine (HUVEC) sont utilisées. En effet, les HUVEC sont faciles à obtenir et à cultiver. Des HUVEC exprimant la protéine fluorescente rouge (RFP) ou la protéine fluorescente verte (GFP) sont disponibles dans le commerce, ce qui permet de suivre leur évolution en direct dans les puces microfluidiques. Très récemment, Wan et al.⁸⁹ ont généré des MVN en utilisant des HUVEC immortalisées pour surmonter les problèmes dus aux variations d'un lot à l'autre des cellules primaires provenant de différents donneurs. Bien que limitées aux groupes de S.C. George et C.C.W. Hughes, les cellules formant des colonies endothéliales (ECFC pour Endothelial Colony Forming Cells en anglais) ont été utilisées dans 16% des articles examinés. Comparées aux HUVEC, les ECFC dérivées du sang de cordon ont un plus grand potentiel vasculogénique²⁷. Récemment, certains groupes ont travaillé avec des cellules endothéliales dérivées de cellules souches humaines pluripotentes (hPSC-EC)^{37,90-92}, ce qui ouvre la voie à une source illimitée de cellules endothéliales d'une part et à la possibilité de générer de véritables réseaux microvasculaires avec tous leurs constituants d'autre part. Enfin, seuls 6 % des articles examinés ont utilisé d'autres types de cellules endothéliales, notamment des cellules endothéliales lymphatiques, des cellules endothéliales cérébrales ou des cellules endothéliales microvasculaires dermiques humaines.

Dans les puces vasculogénèse, étant donné que les cellules endothéliales sont préalablement incorporées dans l'hydrogel, l'ensemencement des cellules dans la puce est déterminé au moment de l'injection de l'hydrogel. Dans les puces d'angiogénèse, les cellules sont ensemencées indépendamment pour former des monocouches endothéliales sur les parois de l'hydrogel. Ainsi, les puces microfluidiques sont généralement inclinées de 90° pendant 30 minutes pour permettre aux cellules endothéliales d'adhérer à la surface de l'hydrogel. Il est intéressant de noter que la plateforme microfluidique (Sphero-IMPACT) conçue par Ko et al.⁹³ surmonte cette limitation grâce à l'interface gel-milieu de forme concave, permettant un revêtement facile des canaux latéraux (Fig. 1C1 ii).

2.3 Nature de l'hydrogel et injection dans la puce

Comme indiqué ci-dessus, les dispositifs de MVN-sur-puce comprennent un hydrogel mimant le microenvironnement cellulaire et permettant le développement de réseaux microvasculaires. La plupart des hydrogels utilisés sont naturels (généralement composés de collagène, de fibrine ou d'une combinaison des deux⁹⁴). Par ailleurs, quelques études montrent de bons résultats avec des extraits de membrane basale (BME pour Basal Membrane Extract

en anglais) tels que le Matrigel^{35,69,74} (une matrice extracellulaire décellularisée obtenue à partir d'ostéosarcome murin), ou avec des hydrogels synthétiques⁹⁵. Les hydrogels naturels ont l'avantage d'être faciles à utiliser et biocompatibles, mais contrairement aux hydrogels synthétiques, leurs propriétés mécaniques et chimiques ne sont pas facilement personnalisables ni toujours très reproductibles. Par conséquent, il est important de poursuivre les efforts de développement des hydrogels synthétiques afin d'éviter les effets de variabilité d'un lot à l'autre.

L'injection des hydrogels dans les puces microfluidiques est souvent décrit comme une étape délicate par les expérimentateurs eux-mêmes. En raison de sa polymérisation rapide, l'hydrogel doit être injecté en quelques secondes dans la puce microfluidique. En effet, après l'ajout de thrombine, une enzyme qui transforme le fibrinogène en fibrine, un gel de fibrine se forme, et le gel durci ne peut plus être manipulé. D'autre part, comme l'emplacement du gel sur la puce est généralement contrôlé par des techniques très dépendantes de la pression de travail (utilisation de murets, de piliers, de valves capillaires etc.), il doit être injecté aussi délicatement et lentement que possible. L'équilibre entre une injection rapide pour éviter la polymérisation précoce du gel, et lente pour éviter les fuites de gel vers les canaux adjacents, est difficile à trouver. Pour résoudre ce problème, les expérimentateurs travaillent parfois sur de la glace afin de ralentir le processus de polymérisation. Bien que, pour ceux qui utilisent ces dispositifs au quotidien, ces astuces peuvent apparaître comme des solutions robustes, ces techniques ne correspondent pas au souhait d'automatisation et de simplification des dispositifs microfluidiques pour une utilisation plus large. En définitive, cette opération de remplissage de la chambre centrale nécessite une certaine formation et ne peut être déléguée à une personne non experte. Il est à noter que le remplissage du gel a été effectué manuellement (par pipetage) dans presque tous les articles examinés. Une méthode alternative couramment utilisée consiste à utiliser des tiges, des aiguilles ou du fil (type fil de pêche) qui sont retirés après la polymérisation de l'hydrogel, afin de former des canaux creux (de diamètre des tiges, aiguilles ou fils utilisés) bordant la chambre centrale^{59,64,67,96-100}.

Soulignons que Nishimura et al.¹⁰¹ ont récemment présenté une architecture microfluidique et un processus d'injection du gel qui diffèrent grandement des études conventionnelles. En utilisant des pousse-seringues à des débits contrôlés, l'hydrogel a été injecté dans le microcanal, puis évacué par aspiration en sortie du canal. L'hydrogel est resté par capillarité à un endroit prédéfini où un sphéroïde constitué de cellules endothéliales a été piégé. Après quelques jours de culture, des bourgeonnements endothéliaux se sont développés à la périphérie du sphéroïde et ont envahi l'hydrogel. Dans une plateforme microfluidique innovante dédiée au criblage de médicaments anti-angiogéniques, Kim et al.⁸⁴ ont également injecté la solution d'hydrogel à l'aide d'un pousse-seringue. Grâce à un niveau supplémentaire en PDMS, ils ont pu remplir quatorze microcanaux en parallèle de manière très robuste. De manière originale, Pei et al.¹⁰² ont utilisé une barrière élastique réversible pour déterminer l'emplacement de l'hydrogel. Une membrane flexible était prise en sandwich entre un niveau pneumatique (pour l'actionnement de la membrane) et niveau fluide (dans lequel était

effectuée la culture cellulaire). La membrane, lorsqu'elle était actionnée pneumatiquement, pouvait ainsi être soufflée vers le niveau fluide. Par rapport aux méthodes classiques de localisation de l'hydrogel par des micropiliers, cette approche permet d'obtenir un flux interstitiel plus uniforme dans la chambre centrale. Aussi, Lee et al.⁶⁸ et Lim et al.¹⁰³ ont conçu des dispositifs microfluidiques où le placement de l'hydrogel a été réalisé par capillarité. Enfin, Wang et al.¹⁰⁴ ont également fait des efforts pour faciliter l'injection de l'hydrogel, en intégrant un module régulateur de pression dans leur circuit microfluidique pour une injection facile et robuste de l'hydrogel.

2.4 Incorporation d'organoïdes/sphéroïdes

Dans certaines études, les dispositifs de MVN-sur-puce ne sont pas seulement composés d'un réseau microvasculaire, mais intègrent également un ou plusieurs agrégats cellulaires 3D, qui peuvent être des sphéroïdes pré-vascularisés⁷¹, des îlots pancréatiques¹⁰⁵ ou encore des organoïdes de côlon¹⁰⁶. Nous regrouperons ces objets biologiques sous la dénomination « organoïde/sphéroïde » ici. Il est essentiel de fournir un système vasculaire aux tissus biologiques de plus de quelques centaines de micromètres d'épaisseur pour prévenir l'apparition de cœurs nécrotiques¹⁰⁷, c'est pourquoi il est particulièrement intéressant d'incorporer des sphéroïdes et des organoïdes dans les plateformes MVN^{27,108}. Il est important de noter que de nombreux efforts récents ont été consacrés à l'ingénierie d'organoïdes vascularisés^{19,109,110} ; ainsi la culture de tels organoïdes dans des dispositifs de MVN est susceptible de devenir un objectif majeur dans ce domaine au cours des prochaines années. C'est un point sur lequel nous reviendrons en fin de chapitre.

Parmi toutes les études sur les MVN-sur-puce examinées ici, vingt incorporaient un ou plusieurs organoïdes/sphéroïdes. On peut noter que ces dispositifs n'intègrent que rarement une localisation précise des organoïdes/sphéroïdes, qui atteignent alors des zones aléatoires dans la microchambre centrale (Fig. 2A). Cela peut être problématique en termes de reproductibilité expérimentale, car un organoïde/sphéroïde très proche d'un canal latéral ne recevra pas la même quantité d'oxygène et de nutriments qu'un autre situé au milieu de la microchambre. En outre, l'absence de systèmes de piégeage des organoïdes/sphéroïdes est problématique pour l'imagerie optique automatisée.

Afin d'assurer un meilleur contrôle de l'emplacement de l'organoïde/sphéroïde, certains ont proposé des améliorations à l'architecture classique présentée précédemment. Une possibilité est de concevoir une puce microfluidique avec un puits spécifique pour le dépôt de l'organoïde/sphéroïde, débouchant sur la chambre centrale^{31,87,93,111,112}. L'organoïde/sphéroïde peut ainsi être maintenu au fond du puits si son diamètre est supérieur à la hauteur de la microchambre (Fig. 2B). Avec une autre approche, Wang et al.⁷⁴ ont conçu une zone de piégeage de l'organoïde/sphéroïde délimitée par des micropiliers rectangulaires (Fig. 2C). Oh et al.⁴⁴ ont développé un système microfluidique similaire avec des micropores permettant la co-culture de réseaux endothéliaux et de tissus biologiques 3D (Fig. 2D). Dans

cette étude, les sphéroïdes tumoraux ont naturellement bouché les micropores, assurant ainsi une grande proximité entre les tumoroïdes et les réseaux microvasculaires. Nishimura et al.¹⁰¹ ont proposé une configuration innovante permettant le piégeage automatisé des organoïdes/sphéroïdes dans des sites individuels (Fig. 2E). Bien que de nombreuses autres méthodes ingénieuses de piégeage des organoïdes/sphéroïdes existent déjà dans le domaine de la microfluidique, telles que des microcanaux parallèles agissant comme un filtre¹¹³, la sédimentation dans des micropuits¹¹⁴, l'actionnement de chambres pneumatiques¹¹⁵, les flux microrotationnels¹¹⁶ ou les architectures en serpentins¹¹⁷⁻¹¹⁹, elles doivent encore être adaptées aux conceptions des puces dédiées aux MVN.

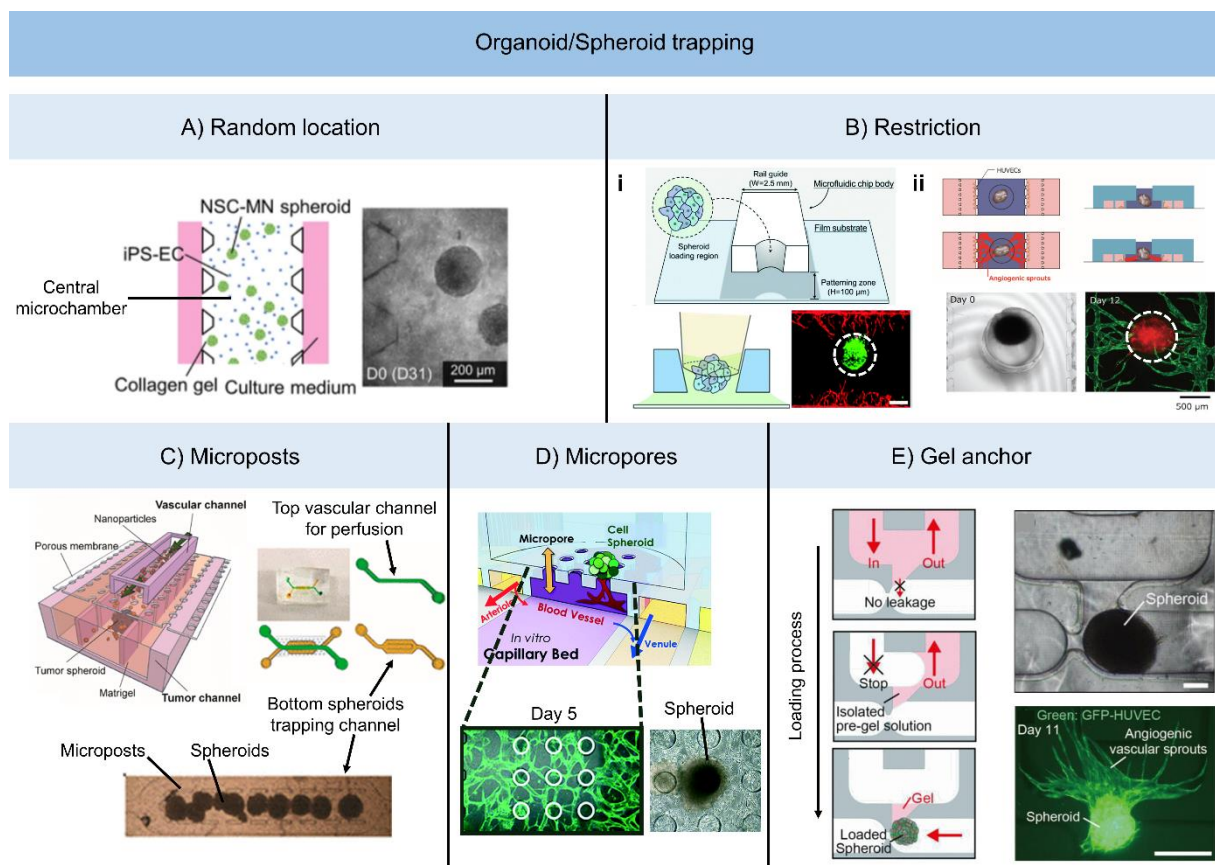


Figure 2 : Méthodes de piégeage et localisation des organoïdes/sphéroïdes dans les puces microfluidiques.

3 Contrôle des écoulements

3.1 Différentes approches pour générer l'écoulement

43% des études que nous avons examinées ont été menées dans des conditions statiques. Bien que certaines aient démontré qu'il est possible de former un réseau endothélial fonctionnel de cette manière⁹¹, le rôle clé que jouent les écoulements, en particulier les flux interstitiels, pour le développement des réseaux microvasculaires, a été clairement établi dans différentes études^{86,120}. Par exemple, Moya et al.¹²¹ ont observé la formation de réseaux perfusables dans

les microchambres uniquement lorsque celles-ci étaient exposées à un certain flux, et Vickerman et al.¹²² ont montré que les flux transendothéliaux favorisent l'angiogenèse. Kim et al.¹²³ ont découvert que le flux interstitiel, selon la direction du flux, pouvait soit promouvoir soit inhiber les bourgeonnements angiogéniques, offrant ainsi de nouvelles pistes pour traiter l'angiogenèse tumorale. Hsu et al.⁵⁸ ont montré que des flux interstitiels élevés ou au contraire presque nuls (hypoxie) pouvaient indépendamment stimuler ou inhiber la vasculogenèse. Pour ces raisons, le contrôle à la fois de l'intensité et de la direction des écoulements doit être une préoccupation majeure des études dédiées aux MVN-sur-puce.

La plupart des études que nous avons examinées reposaient sur la pression hydrostatique pour contrôler les écoulements (Fig. 3A). Si cette solution peu coûteuse offre évidemment l'avantage de la simplicité, elle présente l'inconvénient majeur de ne pas pouvoir maintenir un débit constant dans le temps, car la hauteur de liquide dans les différents réservoirs change constamment. Cela conduit généralement les expérimentateurs à changer les milieux de culture dans les réservoirs tous les jours pour minimiser l'impact d'un flux non constant¹²⁴⁻¹²⁶. Pour surmonter cette difficulté, Wang et al.¹²⁷ ont intégré à leur plateforme microfluidique un module de pompage passif actionné par pression hydrostatique (Fig. 3B). Grâce à une fonction d'auto-remplissage par siphon, ils ont pu maintenir un débit constant jusqu'à 5 jours dans une puce vasculogenèse. Une autre façon de traiter ce problème est de placer les puces microfluidiques sur des systèmes à bascule (Fig. 3C). Nous avons recensé huit articles utilisant un tel dispositif, présentant une plus grande autonomie et un encombrement limité. Cependant, cette approche génère des flux bidirectionnels non constants et ne peut donc pas reproduire correctement la physiologie de l'homme, chez qui les cellules endothéliales se polarisent habituellement contre le flux. Globalement, les débits qui peuvent être obtenus grâce aux différences de pression hydrostatique sont relativement faibles. Cela peut être problématique pour générer des flux physiologiquement pertinents, comme indiqué dans l'étude de Phan et al.¹²⁸, où les contraintes de cisaillement exercées sur les capillaires se sont avérées deux fois plus faibles que ce qui peut être observé *in vivo*.

Nous avons trouvé douze articles utilisant des pousse-seringues pour contrôler le débit dans leurs dispositifs microfluidiques (Fig. 3D). Grâce aux pousse-seringues, une large gamme de débits est rendue accessible, indépendamment de la conception de la puce ou des propriétés du liquide. Pour les MVN-sur-puce, où l'on souhaite généralement contrôler le débit plutôt que la pression afin d'imposer des vitesses d'écoulement et des contraintes de cisaillement physiologiques dans les réseaux microvasculaires perfusables, les pousse-seringues semblent être une solution technique sous-utilisée. Toutefois, cela peut s'expliquer par l'encombrement et le coût important de ces dispositifs par rapport aux systèmes à écoulement par gravité. De plus, les pousse-seringues ne sont généralement pas conçus pour fonctionner dans un environnement humide et doivent donc être placés à l'extérieur de l'incubateur. Cela signifie que les tubes doivent être déconnectés à chaque fois que les expérimentateurs veulent observer la puce microfluidique au microscope, avec les risques associés de contamination et de formation de bulles d'air dans le circuit fluidique. Cependant, Bai et al.⁷⁷ ont mené leur étude

avec le pousse-seringue à l'intérieur de l'incubateur, suggérant une certaine compatibilité entre ce type d'appareil et les incubateurs classiquement utilisés pour la culture cellulaire. En connectant les réservoirs de milieu à l'entrée du circuit fluidique et le pousse-seringues en mode aspiration à la sortie de la puce microfluidique, les auteurs de cette étude ont pu maintenir un gradient de concentration de VEGF stable dans des conditions d'écoulement, d'une manière relativement compacte.

De façon surprenante, nous n'avons pas trouvé d'article rapportant l'utilisation d'une pompe péristaltique classique pour contrôler les flux dans les MVN. Les pompes péristaltiques sont pourtant largement utilisées en biologie car elles constituent une solution technique pratique et facile à mettre en place. Elles peuvent être utilisées pour fournir des débits élevés et permettre la recirculation du milieu, ce qui peut être utile pour économiser le milieu de culture ou pour enrichir le milieu avec des sécrétions cellulaires. Cependant, dans ces configurations fermées, l'utilisation d'un matériau perméable est nécessaire afin de tamponner le milieu avec du CO₂. De plus, il est nécessaire de déconnecter le circuit microfluidique pour changer le milieu de culture. Offeddu et al.¹²⁹ ont cependant récemment proposé une pompe microfluidique permettant la perfusion de réseaux microvasculaires pendant 7 jours à des débits physiologiques (Fig. 3E). Cette solution technique permet à la fois la recirculation du milieu et un flux unidirectionnel, contrairement aux plateformes à bascule. De manière intéressante, les auteurs ont constaté une augmentation de l'étanchéité des réseaux endothéliaux après 24 h de culture sous flux par rapport aux conditions statiques.

Enfin, nous n'avons noté que trois articles utilisant un régulateur de pression pour contrôler les écoulements (Fig. 3F). Ces études, menées au sein d'un même groupe de recherche, ont utilisé des régulateurs de pression (FlowEZ, Fluigent) pour appliquer un flux luminal (c'est-à-dire mimant le flux sanguin dans les vaisseaux creux) et interstitiel (c'est-à-dire mimant le flux à travers la matrice extracellulaire) dans le tissu endothélial¹³⁰⁻¹³². Les auteurs ont également donné les vitesses d'écoulement dans les puces d'une part à l'aide d'un modèle numérique, et d'autre part en mesurant expérimentalement les vitesses de microbilles fluorescentes perfusées dans le dispositif. Si les contrôleurs de pression ne sont pas fréquemment utilisés pour les MVN-sur-puce, c'est peut-être parce qu'ils nécessitent une alimentation en air comprimé, qu'ils ne peuvent pas être placés dans des incubateurs humides et qu'ils offrent des avantages tels qu'une grande stabilité du débit ou un temps de réponse rapide qui ne sont pas cruciaux pour les applications MVN. Néanmoins, les chercheurs du domaine pourraient bénéficier de certaines des caractéristiques des contrôleurs de pression, comme la possibilité de programmer des schémas d'écoulement complexes. Par exemple, il a été démontré que les cellules endothéliales sont sensibles aux harmoniques de fréquence des contraintes de cisaillement complexes¹³³. De tels mécanismes pourraient être étudiés dans des puces microfluidiques, en utilisant des contrôleurs de pression de haute précision. Les contrôleurs de pression ouvrent également la voie vers une parallélisation facile des systèmes, étant donné qu'une source de pression peut être divisée en plusieurs canaux. De manière générale, il est à ce jour encore peu clair laquelle des conditions de travail (débit imposé ou pression imposée)

représente le meilleur modèle physiologique. Le système vasculaire *in vivo* est un problème de biophysique complexe faisant intervenir des écoulements pulsés dans des matériaux déformables qui évoluent dans le temps, des phénomènes de convection et de diffusion qui régissent l'orientation des cellules etc. Des études supplémentaires pour élucider certains de ces aspects devront être menées.

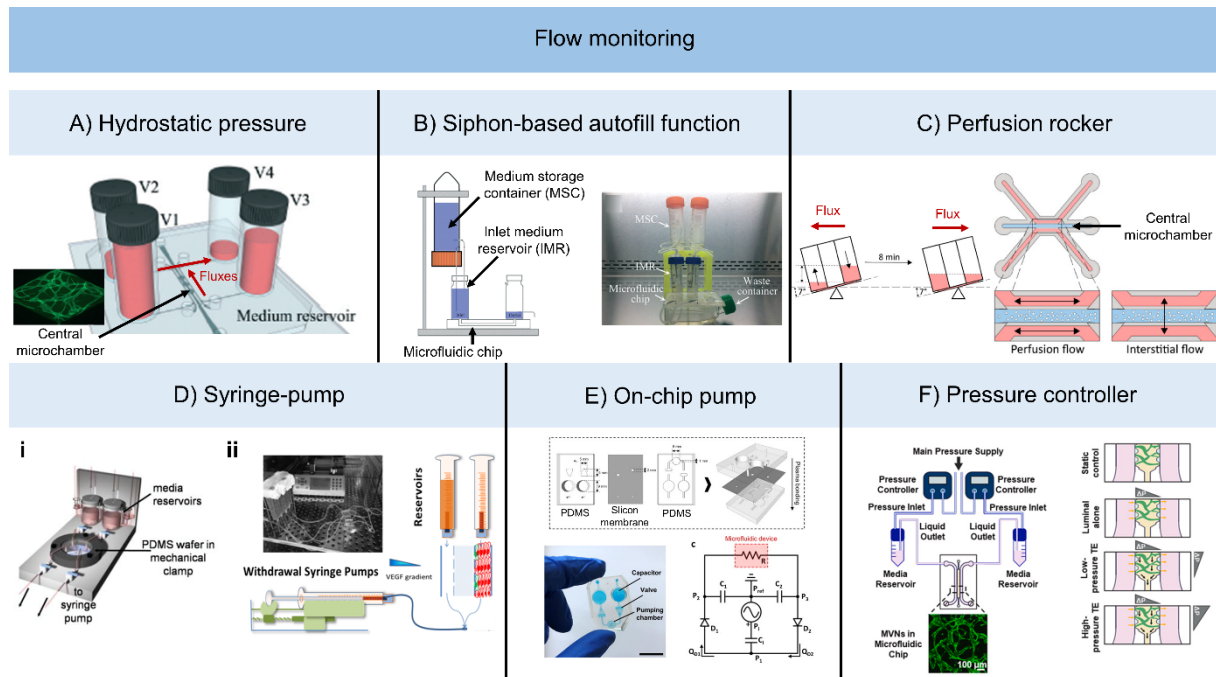


Figure 3 : Ensemble des solutions techniques retenues pour générer les écoulements dans les dispositifs de MVN-sur-puce.

3.2 Evaluation de la pertinence physiologique des flux générés

In vivo, le système vasculaire en développement est soumis à une grande variété de stimuli mécaniques, notamment le flux sanguin unidirectionnel et le flux interstitiel. Reproduire ces flux dans les systèmes de MVN-sur-puce est vital du point de vue de la pertinence physiologique de ces modèles *in vitro*. Par exemple, il est bien connu que le flux interstitiel joue un rôle clé dans l'auto-organisation des réseaux vasculaires¹³⁴, tandis que le suivi du flux sanguin convectif est crucial pour étudier l'extravasation des cellules tumorales circulantes¹³⁵.

Bien que plusieurs groupes aient fait des efforts significatifs pour prendre en compte ces aspects dynamiques, la caractérisation des dispositifs microfluidiques sous flux est souvent incomplète. En effet, dans la plupart des articles, seul le flux interstitiel est considéré, souvent uniquement à l'aide d'une simulation numérique. En effet, le flux interstitiel est facile à induire dans les conceptions conventionnelles de MVN-sur-puce, en contrôlant les pressions hydrostatiques des différents réservoirs, qui varient de 2 à 25 mmH₂O, résultant en des vitesses de 0.1 $\mu\text{m/s}$ - 10 $\mu\text{m/s}$ à travers la chambre centrale gélifiée¹³⁶. De manière plus complète, Offeddu et al.¹³⁰, ont proposé un modèle intéressant en mesurant la perméabilité, la conductivité hydraulique et les vitesses des flux interstitiels générés dans les puces

microfluidiques. De plus, bien que de nombreuses études aient montré des réseaux perfusables, les vitesses de convection dans les vaisseaux auto-assemblés ont été mesurées dans de rares études uniquement^{121,129,131}. Au contraire, Moya et al.¹²¹ ont non seulement analysé la distribution de la pression dans leur dispositif microfluidique par le biais de simulations par éléments finis, mais ont également mesuré les vitesses expérimentales des microbilles circulant dans les réseaux vasculaires, et calculé les taux de cisaillement à la paroi associés. En contrôlant la pression, les auteurs ont ainsi pu générer des flux avec des vitesses d'écoulement allant de 0 à 4000 $\mu\text{m/s}$ et des taux de cisaillement allant de 0 à 1000 s^{-1} . En guise de remarque générale, étant donné que les OoC ne se répandront dans les industries et les hôpitaux que s'ils démontrent leur pertinence physiologique, nous soutenons qu'une plus grande attention doit être accordée aux flux qui peuvent ou ne peuvent pas être obtenus au sein des puces microfluidiques. Il serait préférable que les flux physiologiques interstitiel (allant de 0,1 $\mu\text{m/s}$ à 10 $\mu\text{m/s}$ ^{ref.137}) et luminal (vitesses typiques de quelques mm/s dans les artérioles et les capillaires, avec des taux de cisaillement associés de 1900 - 2800 s^{-1} ^{ref.138}) puissent être accessibles dans les plateformes de MVN-sur-puce.

En outre, très peu d'études prennent en compte d'autres stimuli mécaniques. De manière remarquable, Offeddu et al.¹³⁹ ont très récemment développé des modèles de cancer du sein personnalisés et vascularisés sur puce, dans lesquels ils ont montré qu'une pression élevée du fluide interstitiel dans le microenvironnement tumoral diminue le transport de médicaments à travers le MVN malgré une perméabilité des vaisseaux accrue. Ahn et al.¹⁴⁰ ont développé une puce microfluidique incorporant une membrane en PDMS actionnée pneumatiquement pour modéliser la compression des tissus vasculaires. Il est intéressant de noter que les auteurs ont constaté une diminution de la viabilité cellulaire et une augmentation de la perméabilité des vaisseaux endothéliaux dans les puces cultivées dans des conditions de stress élevé par rapport aux conditions de contrôle où aucune pression n'était appliquée. La simulation d'un tel stress biomécanique dans les dispositifs de MVN-sur-puce est une façon prometteuse de modéliser les pathologies vasculaires induite par ce stress.

4 Vers une automatisation et une industrialisation des dispositifs microfluidiques

Nous avons identifié quelques axes sur lesquels les chercheurs du domaine devront travailler afin de permettre l'émergence de cette technologie dans l'industrie. Tout d'abord, bien que le PDMS soit largement utilisé dans le milieu académique, il est difficile à industrialiser. Une deuxième contrainte est donnée par l'industrie pharmaceutique qui nécessite des systèmes à haut débits pour les applications de criblage de médicaments. Enfin, une approche d'intégration des dispositifs microfluidiques est nécessaire, afin de construire des microsystèmes faciles d'utilisation et capables de fournir un bon niveau d'analyse.

4.1 Fabrication des puces microfluidiques, parallélisation et standardisation

Les puces en PDMS représentent 82% des puces microfluidiques utilisées dans les articles examinés ici. Le PDMS est en effet un choix privilégié en microfluidique en raison de sa facilité de fabrication et de son faible coût. Entre autres avantages, le PDMS est perméable aux gaz, biocompatible et optiquement transparent, ce qui constitue des atouts précieux pour le développement et l'observation des cultures cellulaires. Cependant, le PDMS présente des inconvénients. La perméabilité au gaz génère de petites bulles qui peuvent perturber les expériences, et dont il peut être difficile de se débarrasser. Le procédé de « soft lithography » utilisé pour la fabrication des puces en PDMS n'est pas adapté aux applications qui nécessitent une production à grande échelle, ce qui limite son potentiel pour l'industrie¹⁴¹. De plus, le PDMS absorbe diverses petites molécules : ceci est particulièrement problématique pour toute étude d'évaluation pharmaceutique. Enfin, la métallisation du PDMS et donc l'intégration de biocapteurs ou d'électronique est délicate. Il n'est donc pas surprenant que la plupart des puces sans PDMS utilisées dans les études analysées ici aient été développées par des entreprises comme AIM Biotech et Mimetas, qui fabriquent leurs puces microfluidiques avec des polymères biocompatibles et à faible absorption de molécules. Il convient de noter que ces deux sociétés proposent un certain degré de standardisation de leurs dispositifs, notamment des ports de connexion luer standard ou un format de plaque 384 puits (figure 4A). De même, les plateformes commercialisées de Curiochips Inc. ont été développées par le groupe de Noo Li Jeon en mettant l'accent sur la compatibilité avec les applications à haut débits, en utilisant des techniques de fabrication et des matériaux (polystyrène et polycarbonate) adaptés à la production à grande échelle^{38,68,93,112,142}. Pour ces raisons, ces dispositifs présentent un potentiel considérable dans l'amélioration des processus de développement des médicaments à un niveau industriel.

La robustesse, l'efficacité et la facilité d'utilisation sont des facteurs clés pour réaliser le potentiel des plateformes microfluidiques dans les industries et les hôpitaux. Des efforts de standardisation et de multiplexage de ces dispositifs microfluidiques sont donc nécessaires. Bien que cela n'ait pas été l'objectif principal de la majorité des articles que nous avons étudiés, plusieurs se distinguent par leur inclination à aborder ces points cruciaux. En calculant les chutes de pression à travers une conception microfluidique innovante, Hsu et al.¹⁴³ ont connecté en série jusqu'à 30 réseaux microvasculaires dans des microchambres en forme de losange (Fig. 4B), tandis que Yue et al.¹⁴⁴, du même groupe, ont fabriqué de façon similaire, un dispositif microfluidique à deux niveaux intégrant jusqu'à 9 microtissus vascularisés. D'autres ont développé des dispositifs microfluidiques adaptés au format de plaques de 96 ou 384 puits afin d'offrir une plus grande flexibilité^{32,35,76,93,112,145-147}. De façon remarquable, Phan et al.¹²⁸ ont conçu un réseau de 12 puces incorporant des microtumeurs vascularisées, afin de tester des médicaments anti-angiogéniques et anti-tumoraux (Fig. 4C). Leur dispositif, basé sur un écoulement généré par pression hydrostatique et adapté à un format de plaque 96 puits, permettait l'extraction de tissus et l'analyse ultérieure de l'expression des gènes. Dans le but de permettre de plus hautes performances, Rajasekar et al.³⁵ ont mis au point une plateforme permettant de cultiver 128 organoïdes de côlon vascularisés dans un format de plaque 384

puits (figure 4D). La plateforme a été placée sur un système à bascule, permettant une perfusion continue à travers les réseaux endothéliaux fonctionnels formés autour des organoïdes. Les auteurs ont constaté que les organoïdes se développaient beaucoup mieux dans la plateforme sous perfusion constante par rapport aux conditions statiques conventionnelles, montrant ainsi l'utilité de leur dispositif.

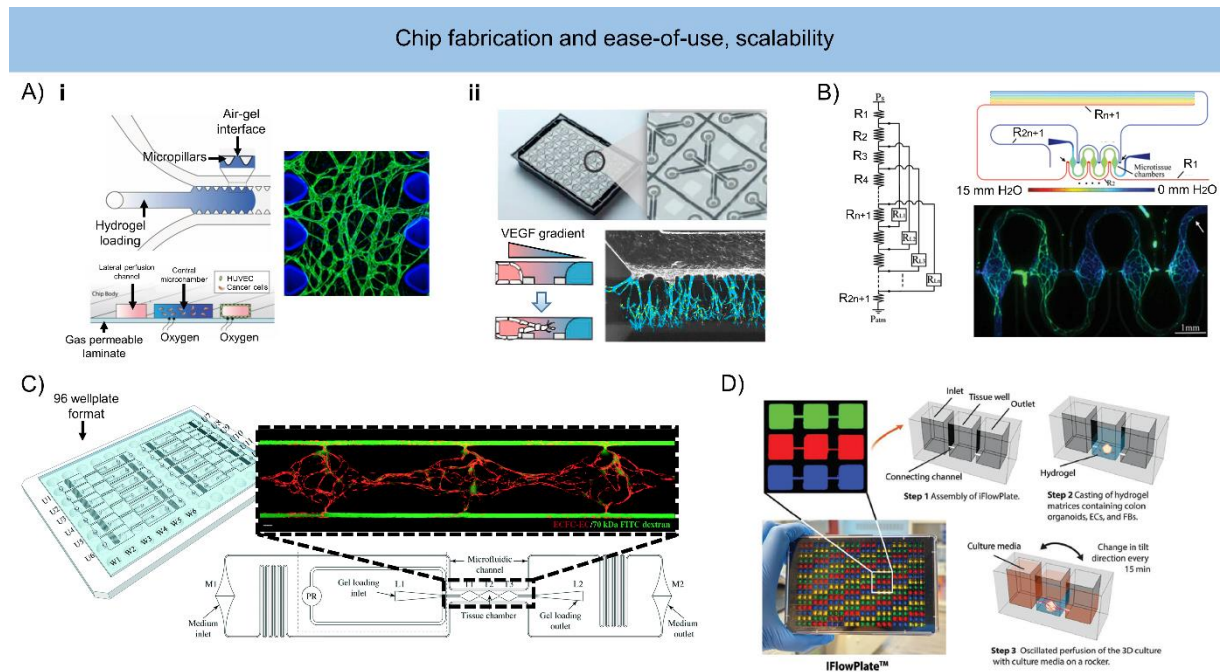


Figure 4 : Différentes solutions proposées dans la littérature scientifique pour améliorer les performances des MVN-sur-puce et faciliter leur industrialisation.

4.2 Intégration des fonctions de suivi et de détection sur puce

Idéalement, on aimerait aboutir à un système intégré dans lequel le contrôle du flux, la collecte des sécrétions et l'analyse des sécrétions peuvent être effectués *in situ*. Le chemin à parcourir pour réaliser de tels systèmes microphysiologiques est encore long, car les études sur les MVN-sur-puce se limitent souvent à des mesures optiques pour évaluer le développement et la fonctionnalité des réseaux endothéliaux (basées sur l'analyse de paramètres morphologiques des réseaux tels que la longueur ou le diamètre des vaisseaux, la densité des jonctions, etc.), ou pour évaluer l'effet d'un médicament sur les microtissus cultivés. Couplées aux techniques d'immunomarquage, ces observations peuvent fournir de nombreuses informations précieuses. Néanmoins, nous pouvons mentionner quelques études qui ont non seulement réalisé des lectures optiques, mais aussi poussé l'analyse plus loin.

Plusieurs groupes ont proposé une analyse de l'expression des gènes par PCR quantitative en temps réel, après extraction du tissu de la puce microfluidique^{37,90,148} (Fig. 5A i). Récemment, Shin et al.¹¹² ont montré que l'expression des gènes BAX, BAD et P53, qui jouent des rôles clés dans la mort cellulaire apoptotique, était réduite dans la culture vascularisée sur puce par rapport à la culture classique (Fig. 5A ii). Phan et al.¹²⁸ ont pu étudier les niveaux d'expression

des gènes dans leur plateforme microfluidique en perfusant les MVN avec du TNF- α , ce qui, comme attendu, a contribué à la surexpression des gènes VCAM-1, E-Selectin et ICAM-1 (Fig. 5A iii). Enfin, Ayuso et al.⁹⁶ ont développé un modèle microfluidique de co-culture de vaisseaux lymphatiques et de cancer du sein et ont démontré la surexpression de plusieurs gènes favorisant la croissance des vaisseaux, par rapport aux vaisseaux lymphatiques cultivés seuls (Fig. 5A iv).

En recueillant les surnageants des circuits microfluidiques, il est également possible d'examiner les sécrétions de cytokines, protéines essentielles à la communication entre cellules du système immunitaire⁶⁸. Akinbote et al.¹⁴⁹ et Haase et al.³³ ont ainsi effectué une analyse des cytokines pour étudier leur expression dans diverses conditions de culture (Fig. 5B i et ii). Paek et al.⁹⁹ ont conçu une plateforme intégrant la culture de tissu adipeux, dans laquelle ils ont mesuré la leptine, une adipokine libérée par le tissu adipeux qui joue un rôle clé dans la régulation de l'équilibre énergétique et de la sensibilité à l'insuline (Fig. 5B iii). Un dosage ELISA a révélé une multiplication par deux de la production de leptine dans les tissus adipeux vascularisés par rapport aux tissus adipeux en monoculture. Il convient de noter que, si ces études sont intéressantes dans la mesure où elles intègrent des analyses plus poussées, des méthodes d'analyse conventionnelles hors puce définitives sont encore nécessaires. À l'inverse, Qian et al.¹⁵⁰ ont développé un immunodosage par diffusion Raman amplifiée en surface (SERS, pour Surface Enhanced Raman Scattering en anglais) pour la détection de VEGF directement sur puce, dans un dispositif pour étudier les interactions entre cellules endothéliales et cellules de cancer du sein (Fig. 5B iv).

Les plateformes de MVN-sur-puce peuvent également accueillir des essais biologiques complexes et diverses mesures. Par exemple, Palikuqi et al.¹⁰⁶ ont réalisé un test de sécrétion d'insuline stimulée par le glucose (test GSIS pour Glucose Stimulated Insulin Secretion en anglais) sur puce sur des îlots pancréatiques vascularisés (Fig. 5C i). Les résultats ont montré une amélioration de la fonction des cellules β lorsque les îlots étaient vascularisés. Néanmoins, la quantification de l'insuline par immunodosage ELISA pour la lecture finale a été effectuée hors puce. L'intégration de la détection et de la quantification de l'insuline sur puce, comme l'ont récemment démontré Gliberman et al.¹⁵¹, serait particulièrement bénéfique. Hsu et al.¹⁵² ont conçu un système microfluidique multicouche permettant des expériences de culture cellulaire dans cinq microenvironnements différents (taux d'oxygène variable), en faisant circuler une solution de pyrogallol qui permet une absorption rapide de l'oxygène. Les auteurs ont ainsi pu évaluer les caractéristiques morphologiques des réseaux vasculaires formés dans ces différentes conditions (Fig. 5C ii). Chen et al.¹⁵³ ont intégré des électrodes de platine dans leur puce microfluidique pour mesurer la résistance électrique transépithéliale (TEER pour Transepithelial Electrical Resistance en anglais) afin d'évaluer l'intégrité de la barrière sang-rétine externe (Fig. 5C iii). Enfin, Akasaka et al.⁶⁶ ont présenté un dispositif permettant d'évaluer la perfusabilité des réseaux endothéliaux sans recourir à l'imagerie optique, mais en mesurant la conductance ionique.

L'ensemble de ces études révèle le potentiel des MVN-sur-puce pour intégrer de nombreuses fonctionnalités différentes, de l'analyse de l'expression des gènes au suivi des facteurs micro-environnementaux.

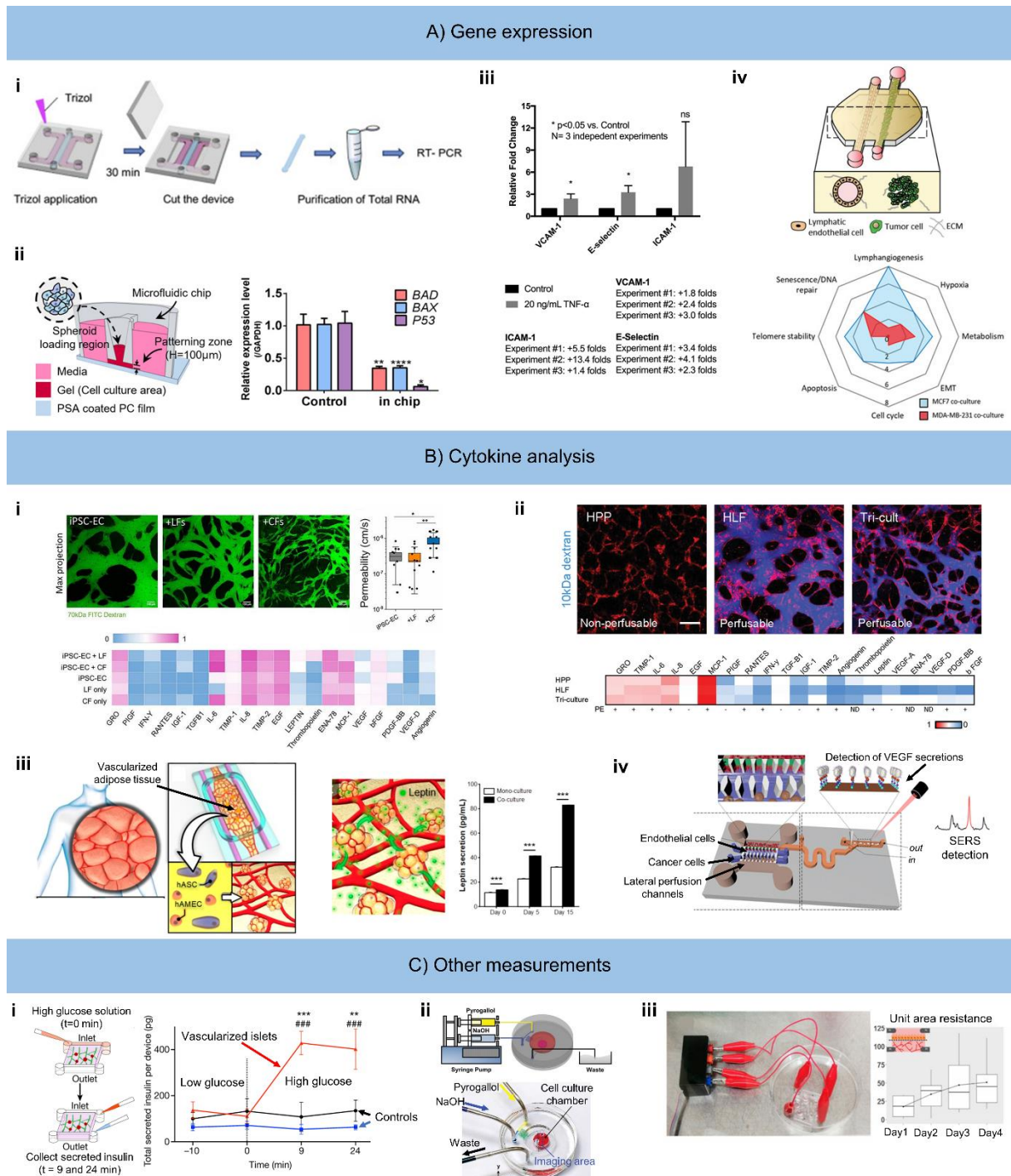


Figure 5 : Analyses complémentaires aux observations optiques pour les MVN-sur-puce.

5 Vascularisation d'organoides-sur-puce

Les organoïdes sont des structures 3D multicellulaires, dérivées de cellules souches (pluripotentes ou adultes), qui reproduisent partiellement des structures et des fonctions

complexes de l'organe *in vivo* qu'ils imitent. Les organoïdes sont d'excellents modèles biologiques qui nous aideront à mieux comprendre la biologie humaine. Ils peuvent être utilisés dans les tests pharmacologiques et toxicologiques pour prédire les réactions humaines aux médicaments, ainsi que pour étudier les principes fondamentaux de la biologie humaine qui sous-tendent le développement des tissus et des maladies. Malgré les progrès rapides de cette technologie, des défis se posent du fait que ces cultures sont souvent dépourvues d'une vascularisation fonctionnelle, ce qui limite leur potentiel pour reproduire fidèlement le développement et les fonctions *in vivo* des organes^{27,108}. L'intégration d'une vascularisation fonctionnelle dans les organoïdes est donc cruciale.

D'autre part, la technologie OoC présente les avantages des inconvénients des organoïdes et *vice versa*. Les OoC permettent en effet un contrôle précis des stimuli, un accès direct aux tissus grâce à la vascularisation couplée à la microfluidique, mais ils reflètent souvent mal la complexité biologique humaine. C'est pourquoi l'industrie pharmaceutique hésite beaucoup à extrapoler à l'homme les résultats de criblage de médicaments obtenus dans de tels modèles OoC¹⁵⁴.

Ainsi, l'idée de coupler ces deux domaines *a priori* distincts a récemment émergé. On s'attend désormais à ce que la convergence de la biologie des cellules souches, de la bio-ingénierie et de la microfluidique ouvre la voie à la résolution des principales limitations actuelles, telles que l'absence de vascularisation fonctionnelle dans les modèles organoïdes.

Exemple frappant de cette synergie, Nikolaev et al.¹⁵⁵ ont cultivé des organoïdes intestinaux dans un canal microfluidique reproduisant les cryptes et les villosités de l'organe *in vivo*, et permettant l'accès direct et la perfusion des mini-intestins. Les auteurs ont connecté leur puce microfluidique à un pousse-seringue pour éliminer les cellules mortes de l'épithélium grâce à une perfusion continue. Ils ont constaté que la durée de vie des organoïdes était ainsi augmentée de plusieurs semaines par rapport aux cultures statiques. Homan et al.²⁶ ont cultivé des organoïdes rénaux à moitié emprisonnés dans une couche de gel dans différentes conditions d'écoulement. Ils ont démontré qu'une forte contrainte de cisaillement induite par l'écoulement favorisait la maturation et la vascularisation des organoïdes par rapport à une faible contrainte de cisaillement ou à des conditions statiques. Rajasekar et al.³⁵ ont quant à eux co-cultivés des organoïdes de côlon dérivés de patients avec des réseaux microendothéliaux auto-assemblés. Les auteurs ont constaté que les organoïdes de côlon se développaient beaucoup mieux dans leur plateforme microfluidique permettant une perfusion continue dans les réseaux, par rapport aux conditions statiques. Dans cette étude, bien que des vaisseaux endothéliaux aient été trouvés à proximité des organoïdes, aucune perfusion intravasculaire dans les organoïdes n'a été démontrée, ni aucune anastomose fonctionnelle entre les réseaux endothéliaux et le système vasculaire interne des organoïdes. De façon remarquable, Wimmer et al.²¹ ont généré des organoïdes de vaisseaux sanguins humains qui se sont auto-organisés en réseaux tridimensionnels interconnectés de capillaires contenant une lumière tapissée de cellules endothéliales, une couverture de pericytes et une membrane basale prototypique. Lors de la transplantation chez la souris, les organoïdes ont formé un arbre

vasculaire stable et entièrement perfusable¹⁹. L'utilisation de ces organoïdes dans des puces microfluidiques fera l'objet du Chapitre 3, dont l'objectif sera de vasculariser ces organoïdes de façon fonctionnelle, à l'aide d'un réseau endothélial HUVEC environnant. Dans l'ensemble, le développement d'organoïdes vascularisés sur puce pourrait ouvrir la voie à l'étude de divers sujets tels que l'augmentation de la durée de vie des organoïdes grâce à la vascularisation, la circulation et le devenir des cellules immunitaires dans les organoïdes, l'exposition à des médicaments, à des stress métaboliques ou encore à des acides nucléiques.

6 Conclusion et perspectives

En définitive, le développement de réseaux microvasculaires sur puce a fait un grand pas en avant, et les futures avancées technologiques pourraient accélérer encore leur adoption par les entreprises pharmaceutiques, notamment pour les processus de découverte et de développement de médicaments¹⁵⁴. Bien qu'ils soient très prometteurs, à ce jour, ces systèmes microphysiologiques manquent très souvent la facilité d'utilisation, l'automatisation et l'intégration nécessaires pour pouvoir être distribués dans les industries et les hôpitaux¹⁵⁶.

En analysant, d'un point de vue technologique, comment les chercheurs du domaine ont choisi de concevoir leurs systèmes et de réaliser leurs expériences, cet état de l'art montre qu'ils sont conscients de ces défis. Au fil des ans, ils ont réussi à intégrer de plus en plus de fonctionnalités dans leurs dispositifs microfluidiques, tout en répondant aux objectifs de standardisation et de simplification des systèmes. Une fois les bases de la conception des puces microfluidiques posées, diverses stratégies ont été élaborées pour mieux contrôler les flux dans les MVN, répondant ainsi à une grande diversité de besoins. Les MVN-sur-puce sont des outils utiles pour les études sur l'angiogenèse, l'extravasation de cellules tumorales, la modélisation de la barrière hémato-encéphalique, les applications de criblage de médicaments ou encore de développement d'organoïdes vascularisés. De tels modèles *in vitro* permettent de prendre en compte les aspects dynamiques généralement absents des méthodes de culture conventionnelles. Des flux physiologiques ont ainsi été mesurés dans des vaisseaux endothéliaux auto-assemblés, avec des vitesses d'écoulement et des contraintes de cisaillement de paroi associées pertinentes. Par ailleurs, nous avons identifié de nombreuses études qui proposaient une analyse plus précise des mécanismes impliqués dans les MVN. L'extraction d'ARN, l'analyse des cytokines, les mesures TEER et les tests biologiques complexes sont autant d'avancées qui ont été réalisées dans les plateformes MVN ces dernières années.

Bien qu'il existe encore certaines limites à l'adoption à grande échelle de ces systèmes microfluidiques par l'industrie, dues en partie au manque de standardisation des méthodes, les progrès rapides qui ont eu lieu dans les systèmes MVN représentent une perspective encourageante pour l'étude du développement du système vasculaire humain, pour la compréhension d'une large gamme de maladies, pour l'amélioration des processus de développement de médicaments, ou encore pour les applications liées à la médecine personnalisée.

Bibliographie

1. Bhatia, S. N. & Ingber, D. E. Microfluidic organs-on-chips. *Nat. Biotechnol.* **32**, 760–772 (2014).
2. Lee, S. H. Advances in dynamic microphysiological organ-on-a-chip: Design principle and its biomedical application. *J. Ind. Eng. Chem.* **71**, 65–77 (2019).
3. Mastrangeli, M., Millet, S., Partners, the O. & Raaij, J. van den E. Organ-on-Chip In Development: Towards a roadmap for Organs-on-Chip. (2019) doi:10.20944/preprints201903.0031.v1.
4. 'Mini Organs-on-Chips: Towards new research models for studying disease and finding treatments'. – Organ-on-Chip. <https://euroocs.eu/mini-organs-on-chips-towards-new-research-models-for-studying-disease-and-finding-treatments/>.
5. Clevers, H. Modeling Development and Disease with Organoids. *Cell* **165**, 1586–1597 (2016).
6. Lancaster, M. A. *et al.* Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. *Nature* **501**, 373–379 (2013).
7. Rossi, G., Manfrin, A. & Lutolf, M. P. Progress and potential in organoid research. *Nat. Rev. Genet.* **19**, 671–687 (2018).
8. Eiraku, M. *et al.* Self-organizing optic-cup morphogenesis in three-dimensional culture. *Nature* **472**, 51–56 (2011).
9. Drost, J. & Clevers, H. Organoids in cancer research. *Nat. Rev. Cancer* **18**, 407–418 (2018).
10. Park, S. E., Georgescu, A. & Huh, D. Organoids-on-a-chip. *Science* (2019) doi:10.1126/science.aaw7894.
11. Zhang, B., Korolj, A., Lai, B. F. L. & Radisic, M. Advances in organ-on-a-chip engineering. *Nat. Rev. Mater.* **3**, 257–278 (2018).
12. Zhang, B. & Radisic, M. Organ-on-a-chip devices advance to market. *Lab. Chip* **17**, 2395–2420 (2017).
13. Hayden, P. J. Cell sources and methods for producing organotypic in vitro human tissue models. *Organ---Chip* 13–45 (2020) doi:10.1016/B978-0-12-817202-5.00002-4.
14. Schork, N. J. Personalized medicine: Time for one-person trials. *Nature* **520**, 609–611 (2015).
15. Perrin, S. Preclinical research: Make mouse studies work. *Nature* **507**, 423–425 (2014).
16. Spence, J. R. *et al.* Directed differentiation of human pluripotent stem cells into intestinal tissue in vitro. *Nature* **470**, 105–109 (2011).
17. Xia, Y. *et al.* The generation of kidney organoids by differentiation of human pluripotent cells to ureteric bud progenitor-like cells. *Nat. Protoc.* **9**, 2693–2704 (2014).
18. Dye, B. R. *et al.* In vitro generation of human pluripotent stem cell derived lung organoids. *eLife* **4**, (2015).
19. Wimmer, R. A. *et al.* Human blood vessel organoids as a model of diabetic vasculopathy. *Nature* **565**, 505–510 (2019).
20. Hofbauer, P. *et al.* Cardioids reveal self-organizing principles of human cardiogenesis. *bioRxiv* 2020.07.06.189431 (2020) doi:10.1101/2020.07.06.189431.
21. Wimmer, R. A., Leopoldi, A., Aichinger, M., Kerjaschki, D. & Penninger, J. M. Generation of blood vessel organoids from human pluripotent stem cells. *Nat. Protoc.* **14**, 3082–3100 (2019).
22. Franco, C. A. *et al.* Dynamic Endothelial Cell Rearrangements Drive Developmental Vessel Regression. *PLOS Biol.* **13**, e1002125 (2015).
23. van den Berg, C. W. *et al.* Renal Subcapsular Transplantation of PSC-Derived Kidney Organoids Induces Neovascularization and Significant Glomerular and Tubular Maturation In Vivo. *Stem Cell Rep.* **10**, 751–765 (2018).
24. Kitano, K. *et al.* Bioengineering of functional human induced pluripotent stem cell-derived intestinal grafts. *Nat. Commun.* **8**, 1–13 (2017).
25. Takebe, T. *et al.* Vascularized and Complex Organ Buds from Diverse Tissues via Mesenchymal Cell-Driven Condensation. *Cell Stem Cell* **16**, 556–565 (2015).
26. Homan, K. A. *et al.* Flow-enhanced vascularization and maturation of kidney organoids in vitro. *Nat. Methods* **16**, 255–262 (2019).
27. Shirure, V. S., Hughes, C. C. W. & George, S. C. Engineering Vascularized Organoid-on-a-Chip Models. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **23**, 141–167 (2021).
28. Sackmann, E. K., Fulton, A. L. & Beebe, D. J. The present and future role of microfluidics in biomedical research. *Nature* **507**, 181–189 (2014).
29. Bang, S. *et al.* 3D Microphysiological System-Inspired Scalable Vascularized Tissue Constructs for Regenerative Medicine. *Adv. Funct. Mater.* **n/a**, 2105475 (2021).

30. Esch, E. W., Bahinski, A. & Huh, D. Organs-on-chips at the frontiers of drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **14**, 248–260 (2015).
31. Nashimoto, Y. *et al.* Integrating perfusable vascular networks with a three-dimensional tissue in a microfluidic device. *Integr. Biol.* **9**, 506–518 (2017).
32. Lin, D. S. Y., Rajasekar, S., Marway, M. K. & Zhang, B. From Model System to Therapy: Scalable Production of Perfusable Vascularized Liver Spheroids in “Open-Top” 384-Well Plate. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **7**, 2964–2972 (2021).
33. Haase, K., Gillrie, M. R., Hajal, C. & Kamm, R. D. Pericytes Contribute to Dysfunction in a Human 3D Model of Placental Microvasculature through VEGF-Ang-Tie2 Signaling. *Adv. Sci.* **6**, 1900878 (2019).
34. Shirure, V. S. *et al.* Tumor-on-a-chip platform to investigate progression and drug sensitivity in cell lines and patient-derived organoids. *Lab. Chip* **18**, 3687–3702 (2018).
35. Rajasekar, S. *et al.* IFlowPlate—A Customized 384-Well Plate for the Culture of Perfusable Vascularized Colon Organoids. *Adv. Mater.* **32**, 2002974 (2020).
36. Oddo, A. *et al.* Advances in Microfluidic Blood–Brain Barrier (BBB) Models. *Trends Biotechnol.* **37**, 1295–1314 (2019).
37. Campisi, M. *et al.* 3D self-organized microvascular model of the human blood-brain barrier with endothelial cells, pericytes and astrocytes. *Biomaterials* **180**, 117–129 (2018).
38. Lee, S.-R. *et al.* Modeling neural circuit, blood–brain barrier, and myelination on a microfluidic 96 well plate. *Biofabrication* **11**, 035013 (2019).
39. Adriani, G., Ma, D., Pavesi, A., Kamm, R. D. & Goh, E. L. K. A 3D neurovascular microfluidic model consisting of neurons, astrocytes and cerebral endothelial cells as a blood–brain barrier. *Lab. Chip* **17**, 448–459 (2017).
40. Bang, S. *et al.* A Low Permeability Microfluidic Blood-Brain Barrier Platform with Direct Contact between Perfusable Vascular Network and Astrocytes. *Sci. Rep.* **7**, 8083 (2017).
41. Hahn, C. & Schwartz, M. A. Mechanotransduction in vascular physiology and atherogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10**, 53–62 (2009).
42. Yeon, J. H., Ryul Ryu, H., Chung, M., Ping Hu, Q. & Li Jeon, N. In vitro formation and characterization of a perfusable three-dimensional tubular capillary network in microfluidic devices. *Lab. Chip* **12**, 2815–2822 (2012).
43. Glaser, D. E. *et al.* Organ-on-a-chip model of vascularized human bone marrow niches. *Biomaterials* 121245 (2021) doi:10.1016/j.biomaterials.2021.121245.
44. Oh, S. *et al.* “Open-top” microfluidic device for in vitro three-dimensional capillary beds. *Lab. Chip* **17**, 3405–3414 (2017).
45. Risau, W. & Flamme, I. Vasculogenesis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **11**, 73–91 (1995).
46. Whisler, J. A., Chen, M. B. & Kamm, R. D. Control of Perfusable Microvascular Network Morphology Using a Multiculture Microfluidic System. *Tissue Eng. Part C Methods* **20**, 543–552 (2012).
47. Kim, S., Lee, H., Chung, M. & Jeon, N. L. Engineering of functional, perfusable 3D microvascular networks on a chip. *Lab. Chip* **13**, 1489–1500 (2013).
48. Kim, S., Park, J., Kim, J. & Jeon, J. S. Microfluidic Tumor Vasculature Model to Recapitulate an Endothelial Immune Barrier Expressing FasL. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **7**, 1230–1241 (2021).
49. Sobrino, A. *et al.* 3D microtumors in vitro supported by perfused vascular networks. *Sci. Rep.* **6**, 1–11 (2016).
50. Xiao, Y. *et al.* Ex vivo Dynamics of Human Glioblastoma Cells in a Microvasculature-on-a-Chip System Correlates with Tumor Heterogeneity and Subtypes. *Adv. Sci.* **6**, 1801531 (2019).
51. Jeon, J. S. *et al.* Human 3D vascularized organotypic microfluidic assays to study breast cancer cell extravasation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **112**, 214–219 (2015).
52. Chen, M. B. *et al.* On-chip human microvasculature assay for visualization and quantification of tumor cell extravasation dynamics. *Nat. Protoc.* **12**, 865–880 (2017).
53. Chen, M. B., Whisler, J. A., Jeon, J. S. & Kamm, R. D. Mechanisms of tumor cell extravasation in an in vitro microvascular network platform. *Integr. Biol.* **5**, 1262–1271 (2013).
54. Chen, M. B., Lamar, J. M., Li, R., Hynes, R. O. & Kamm, R. D. Elucidation of the Roles of Tumor Integrin β 1 in the Extravasation Stage of the Metastasis Cascade. *Cancer Res.* **76**, 2513–2524 (2016).
55. Gilardi, M. *et al.* The driving role of the Cdk5/Tln1/FAK5732 axis in cancer cell extravasation dissected by human vascularized microfluidic models. *Biomaterials* **276**, 120975 (2021).
56. Crippa, M. *et al.* A microphysiological early metastatic niche on a chip reveals how heterotypic cell interactions and inhibition of integrin subunit β 3 impact breast cancer cell extravasation. *Lab. Chip* (2021) doi:10.1039/D0LC01011A.
57. Lam, S. F., Shirure, V. S., Chu, Y. E., Soetikno, A. G. & George, S. C. Microfluidic device to attain high spatial and temporal control of oxygen. *PLOS ONE* **13**, e0209574 (2018).

58. Hsu, Y.-H. *et al.* Full range physiological mass transport control in 3D tissue cultures. *Lab. Chip* **13**, 81–89 (2013).
59. Ngo, M. T., Karvelis, E. & Harley, B. A. C. Multidimensional hydrogel models reveal endothelial network angiocrine signals increase glioblastoma cell number, invasion, and temozolomide resistance. *Integr. Biol.* **12**, 139–149 (2020).
60. Jeon, J. S. *et al.* Generation of 3D functional microvascular networks with human mesenchymal stem cells in microfluidic systems. *Integr. Biol.* **6**, 555–563 (2014).
61. Li, Y. *et al.* Functional human 3D microvascular networks on a chip to study the procoagulant effects of ambient fine particulate matter. *RSC Adv.* **7**, 56108–56116 (2017).
62. Yang, F., Cohen, R. N. & Brey, E. M. Optimization of Co-Culture Conditions for a Human Vascularized Adipose Tissue Model. *Bioengineering* **7**, 114 (2020).
63. Wang, X. *et al.* Engineering anastomosis between living capillary networks and endothelial cell-lined microfluidic channels. *Lab. Chip* **16**, 282–290 (2016).
64. Song, H.-H. G. *et al.* Transient Support from Fibroblasts is Sufficient to Drive Functional Vascularization in Engineered Tissues. *Adv. Funct. Mater.* **n/a**, 2003777.
65. Offeddu, G. S. *et al.* An on-chip model of protein paracellular and transcellular permeability in the microcirculation. *Biomaterials* **212**, 115–125 (2019).
66. Akasaka, R., Ozawa, M., Nashimoto, Y., Ino, K. & Shiku, H. Ion Conductance-Based Perfusability Assay of Vascular Vessel Models in Microfluidic Devices. *Micromachines* **12**, 1491 (2021).
67. Debbi, L., Zohar, B., Shandalov, Y. & Levenberg, S. Integrating Engineered Macro Vessels with Self-assembled Capillaries in 3D Implantable Tissue for Promoting Vascular Integration In-vivo. *bioRxiv* (2020).
68. Lee, S. *et al.* Modeling 3D Human Tumor Lymphatic Vessel Network Using High-Throughput Platform. *Adv. Biol.* **n/a**, 2000195 (2021).
69. Liu, L. *et al.* Biomimetic tumor-induced angiogenesis and anti-angiogenic therapy in a microfluidic model. *RSC Adv.* **6**, 35248–35256 (2016).
70. Nguyen, D.-H. T. *et al.* Biomimetic model to reconstitute angiogenic sprouting morphogenesis in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**, 6712–6717 (2013).
71. Sano, E. *et al.* Engineering of vascularized 3D cell constructs to model cellular interactions through a vascular network. *Biomicrofluidics* **12**, 042204 (2018).
72. Shin, Y. *et al.* Microfluidic assay for simultaneous culture of multiple cell types on surfaces or within hydrogels. *Nat. Protoc.* **7**, 1247–1259 (2012).
73. Vickerman, V., Blundo, J., Chung, S. & Kamm, R. Design, fabrication and implementation of a novel multi-parameter control microfluidic platform for three-dimensional cell culture and real-time imaging. *Lab. Chip* **8**, 1468–1477 (2008).
74. Wang, H.-F. *et al.* Tumor-Vasculature-on-a-Chip for Investigating Nanoparticle Extravasation and Tumor Accumulation. *ACS Nano* **12**, 11600–11609 (2018).
75. Carmeliet, P. & Jain, R. K. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature* **473**, 298–307 (2011).
76. van Duinen, V. *et al.* Perfused 3D angiogenic sprouting in a high-throughput in vitro platform. *Angiogenesis* **22**, 157–165 (2019).
77. Bai, J. *et al.* Angiogenic responses in a 3D micro-engineered environment of primary endothelial cells and pericytes. *Angiogenesis* 1–17 (2020) doi:10.1007/s10456-020-09746-6.
78. Bai, J. *et al.* A novel 3D vascular assay for evaluating angiogenesis across porous membranes. *Biomaterials* **268**, 120592 (2021).
79. Chung, S. *et al.* Cell migration into scaffolds under co-culture conditions in a microfluidic platform. *Lab. Chip* **9**, 269–275 (2009).
80. Farahat, W. A. *et al.* Ensemble Analysis of Angiogenic Growth in Three-Dimensional Microfluidic Cell Cultures. *PLoS ONE* **7**, (2012).
81. Kim, S. Three-dimensional biomimetic model to reconstitute sprouting lymphangiogenesis in vitro. *Biomaterials* **78**, 115–128 (2016).
82. Yamamoto, K. *et al.* The Stabilization Effect of Mesenchymal Stem Cells on the Formation of Microvascular Networks in a Microfluidic Device. *J. Biomech. Sci. Eng.* **8**, 114–128 (2013).
83. Mercurio, A. *et al.* Phthalimide Derivative Shows Anti-angiogenic Activity in a 3D Microfluidic Model and No Teratogenicity in Zebrafish Embryos. *Front. Pharmacol.* **0**, (2019).
84. Kim, C., Kasuya, J., Jeon, J., Chung, S. & D. Kamm, R. A quantitative microfluidic angiogenesis screen for studying anti-angiogenic therapeutic drugs. *Lab. Chip* **15**, 301–310 (2015).

85. Park, J. H. *et al.* Isolinderalactone suppresses human glioblastoma growth and angiogenic activity in 3D microfluidic chip and in vivo mouse models. *Cancer Lett.* **478**, 71–81 (2020).
86. Song, J. W., Bazou, D. & Munn, L. L. Anastomosis of endothelial sprouts forms new vessels in a tissue analogue of angiogenesis. *Integr. Biol.* **4**, 857–862 (2012).
87. Nashimoto, Y. *et al.* Vascularized cancer on a chip: The effect of perfusion on growth and drug delivery of tumor spheroid. *Biomaterials* **229**, 119547 (2020).
88. Xiao, Y. *et al.* Senescent Cells with Augmented Cytokine Production for Microvascular Bioengineering and Tissue Repairs. *Adv. Biosyst.* **3**, 1900089 (2019).
89. Wan, Z. *et al.* A robust vasculogenic microfluidic model using human immortalized endothelial cells and Thy1 positive fibroblasts. *Biomaterials* 121032 (2021) doi:10.1016/j.biomaterials.2021.121032.
90. Hajal, C. *et al.* Engineered human blood–brain barrier microfluidic model for vascular permeability analyses. *Nat. Protoc.* **17**, 95–128 (2022).
91. Osaki, T., Sivathanu, V. & Kamm, R. D. Engineered 3D vascular and neuronal networks in a microfluidic platform. *Sci. Rep.* **8**, 1–13 (2018).
92. Vila Cuenca, M. *et al.* Engineered 3D vessel-on-chip using hiPSC-derived endothelial- and vascular smooth muscle cells. *Stem Cell Rep.* **16**, 2159–2168 (2021).
93. Ko, J. *et al.* Tumor spheroid-on-a-chip: a standardized microfluidic culture platform for investigating tumor angiogenesis. *Lab. Chip* **19**, 2822–2833 (2019).
94. Park, Y. K. *et al.* In Vitro Microvessel Growth and Remodeling within a Three-Dimensional Microfluidic Environment. *Cell. Mol. Bioeng.* **7**, 15–25 (2014).
95. Brown, A. *et al.* Engineering PEG-based hydrogels to foster efficient endothelial network formation in free-swelling and confined microenvironments. *Biomaterials* **243**, 119921 (2020).
96. Ayuso, J. M., Gong, M. M., Skala, M. C., Harari, P. M. & Beebe, D. J. Human Tumor-Lymphatic Microfluidic Model Reveals Differential Conditioning of Lymphatic Vessels by Breast Cancer Cells. *Adv. Healthc. Mater.* **9**, 1900925 (2020).
97. Galie, P. A. *et al.* Fluid shear stress threshold regulates angiogenic sprouting. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**, 7968–7973 (2014).
98. Margolis, E. A. *et al.* Stromal cell identity modulates vascular morphogenesis in a microvasculature-on-a-chip platform. *Lab. Chip* **21**, 1150–1163 (2021).
99. Paek, J. *et al.* Microphysiological Engineering of Self-Assembled and Perfusable Microvascular Beds for the Production of Vascularized Three-Dimensional Human Microtissues. *ACS Nano* **13**, 7627–7643 (2019).
100. Wang, W. Y., Lin, D., H. Jarman, E., J. Polacheck, W. & M. Baker, B. Functional angiogenesis requires microenvironmental cues balancing endothelial cell migration and proliferation. *Lab. Chip* **20**, 1153–1166 (2020).
101. Nishimura, K., Nie, M. & Takeuchi, S. 3D Microfluidic Device for Perfusion Culture of Spheroids. in 998–1001 (IEEE, 2020). doi:10.1109/MEMS46641.2020.9056442.
102. Pei, J., Sun, Q., Yi, Z., Li, Q. & Wang, X. Recoverable elastic barrier for robust hydrogel patterning with uniform flow profile for organ-on-a-chip applications. *J. Micromechanics Microengineering* **30**, 035005 (2020).
103. Lim, J., Choi, H., Ahn, J. & Jeon, N. L. 3D High-Content Culturing and Drug Screening Platform to Study Vascularized Hepatocellular Carcinoma in Hypoxic Condition. *Adv. NanoBiomed Res.* **n/a**, 2100078 (2021).
104. Wang, X. *et al.* An on-chip microfluidic pressure regulator that facilitates reproducible loading of cells and hydrogels into microphysiological system platforms. *Lab. Chip* **16**, 868–876 (2016).
105. Rambøl, M. H., Han, E. & Niklason, L. E. Microvessel Network Formation and Interactions with Pancreatic Islets in Three-Dimensional Chip Cultures. *Tissue Eng. Part A* (2019) doi:10.1089/ten.tea.2019.0186.
106. Palikuqi, B. *et al.* Adaptable haemodynamic endothelial cells for organogenesis and tumorigenesis. *Nature* 1–7 (2020) doi:10.1038/s41586-020-2712-z.
107. Jain, R. K., Au, P., Tam, J., Duda, D. G. & Fukumura, D. Engineering vascularized tissue. *Nat. Biotechnol.* **23**, 821–823 (2005).
108. Zhang, S., Wan, Z. & D. Kamm, R. Vascularized organoids on a chip: strategies for engineering organoids with functional vasculature. *Lab. Chip* **21**, 473–488 (2021).
109. Pham, M. T. *et al.* Generation of human vascularized brain organoids. *Neuroreport* **29**, 588–593 (2018).
110. Hofbauer, P. *et al.* Cardioids reveal self-organizing principles of human cardiogenesis. *Cell* **184**, 3299–3317.e22 (2021).
111. Nashimoto, Y. *et al.* Perfusable Vascular Network with a Tissue Model in a Microfluidic Device. *J. Vis. Exp. JoVE* (2018) doi:10.3791/57242.

112. Shin, N. *et al.* Vascularization of iNSC spheroid in a 3D spheroid-on-a-chip platform enhances neural maturation. *Biotechnol. Bioeng.* **n/a**.
113. Munaz, A., K. Vadivelu, R., St John, J. A. & Nguyen, N.-T. A lab-on-a-chip device for investigating the fusion process of olfactory ensheathing cell spheroids. *Lab. Chip* **16**, 2946–2954 (2016).
114. Astolfi, M. *et al.* Micro-dissected tumor tissues on chip: an ex vivo method for drug testing and personalized therapy. *Lab. Chip* **16**, 312–325 (2016).
115. Liu, W., Wang, J.-C. & Wang, J. Controllable organization and high throughput production of recoverable 3D tumors using pneumatic microfluidics. *Lab. Chip* **15**, 1195–1204 (2015).
116. Ota, H., Kodama, T. & Miki, N. Rapid formation of size-controlled three dimensional hetero-cell aggregates using micro-rotation flow for spheroid study. *Biomicrofluidics* **5**, 034105 (2011).
117. Tan, W.-H. & Takeuchi, S. A trap-and-release integrated microfluidic system for dynamic microarray applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**, 1146–1151 (2007).
118. Nourmohammadzadeh, M. *et al.* A microfluidic array for real-time live-cell imaging of human and rodent pancreatic islets. *Lab. Chip* **16**, 1466–1472 (2016).
119. Zbinden, A. *et al.* Non-invasive marker-independent high content analysis of a microphysiological human pancreas-on-a-chip model. *Matrix Biol.* **85–86**, 205–220 (2020).
120. Abe, Y. *et al.* Balance of interstitial flow magnitude and vascular endothelial growth factor concentration modulates three-dimensional microvascular network formation. *APL Bioeng.* **3**, 036102 (2019).
121. Moya, M. L., Hsu, Y.-H., Lee, A. P., Hughes, C. C. W. & George, S. C. In Vitro Perfused Human Capillary Networks. *Tissue Eng. Part C Methods* **19**, 730–737 (2013).
122. Vickerman, V. & Kamm, R. D. Mechanism of a flow-gated angiogenesis switch: early signaling events at cell–matrix and cell–cell junctions. *Integr. Biol.* **4**, 863–874 (2012).
123. Kim, S., Chung, M., Ahn, J., Lee, S. & Jeon, N. L. Interstitial flow regulates the angiogenic response and phenotype of endothelial cells in a 3D culture model. *Lab. Chip* **16**, 4189–4199 (2016).
124. Sudo, R. *et al.* Transport-mediated angiogenesis in 3D epithelial coculture. *FASEB J.* **23**, 2155–2164 (2009).
125. Alonzo, L. F., Moya, M. L., Shirure, V. S. & George, S. C. Microfluidic device to control interstitial flow-mediated homotypic and heterotypic cellular communication. *Lab. Chip* **15**, 3521–3529 (2015).
126. Song, J. W. & Munn, L. L. Fluid forces control endothelial sprouting. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**, 15342–15347 (2011).
127. Wang, X. *et al.* A hydrostatic pressure-driven passive micropump enhanced with siphon-based autofill function. *Lab. Chip* **18**, 2167–2177 (2018).
128. Phan, D. T. T. *et al.* A vascularized and perfused organ-on-a-chip platform for large-scale drug screening applications. *Lab. Chip* **17**, 511–520 (2017).
129. Offeddu, G. S. *et al.* Microheart: A microfluidic pump for functional vascular culture in microphysiological systems. *J. Biomech.* **119**, 110330 (2021).
130. Offeddu, G. S. *et al.* Application of Transmural Flow Across In Vitro Microvasculature Enables Direct Sampling of Interstitial Therapeutic Molecule Distribution. *Small* **15**, 1902393 (2019).
131. Offeddu, G. S. *et al.* The cancer glycocalyx mediates intravascular adhesion and extravasation during metastatic dissemination. *Commun. Biol.* **4**, 1–10 (2021).
132. Hajal, C., Ibrahim, L., Serrano, J. C., Offeddu, G. S. & Kamm, R. D. The effects of luminal and trans-endothelial fluid flows on the extravasation and tissue invasion of tumor cells in a 3D in vitro microvascular platform. *Biomaterials* **265**, 120470 (2021).
133. Feaver, R. E., Gelfand, B. D. & Blackman, B. R. Human haemodynamic frequency harmonics regulate the inflammatory phenotype of vascular endothelial cells. *Nat. Commun.* **4**, 1–11 (2013).
134. Griffith, L. G. & Swartz, M. A. Capturing complex 3D tissue physiology in vitro. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**, 211–224 (2006).
135. Follain, G. *et al.* Hemodynamic Forces Tune the Arrest, Adhesion, and Extravasation of Circulating Tumor Cells. *Dev. Cell* **45**, 33–52.e12 (2018).
136. Shirure, V. S., Lezia, A., Tao, A., Alonzo, L. F. & George, S. C. Low levels of physiological interstitial flow eliminate morphogen gradients and guide angiogenesis. *Angiogenesis* **20**, 493–504 (2017).
137. Swartz, M. A. & Fleury, M. E. Interstitial Flow and Its Effects in Soft Tissues. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **9**, 229–256 (2007).
138. Hathcock James J. Flow Effects on Coagulation and Thrombosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **26**, 1729–1737 (2006).

139. Offeddu, G. S. *et al.* Personalized models of breast cancer desmoplasia reveal biomechanical determinants of drug penetration. *bioRxiv* 2021.12.12.472296 (2021) doi:10.1101/2021.12.12.472296.
140. Ahn, J. *et al.* Pneumatically Actuated Microfluidic Platform for Reconstituting 3D Vascular Tissue Compression. *Appl. Sci.* **10**, 2027 (2020).
141. Jeon, J. S., Chung, S., Kamm, R. D. & Charest, J. L. Hot embossing for fabrication of a microfluidic 3D cell culture platform. *Biomed. Microdevices* **13**, 325–333 (2011).
142. Lee, Y. *et al.* Microfluidics within a well: an injection-molded plastic array 3D culture platform. *Lab. Chip* **18**, 2433–2440 (2018).
143. Hsu, Y.-H., Moya, M. L., Hughes, C. C. W., George, S. C. & Lee, A. P. A microfluidic platform for generating large-scale nearly identical human microphysiological vascularized tissue arrays. *Lab. Chip* **13**, 2990–2998 (2013).
144. Yue, T. *et al.* A modular microfluidic system based on a multilayered configuration to generate large-scale perfusable microvascular networks. *Microsyst. Nanoeng.* **7**, 1–13 (2021).
145. van Duinen, V. *et al.* 96 perfusable blood vessels to study vascular permeability in vitro. *Sci. Rep.* **7**, 1–11 (2017).
146. van Duinen, V. *et al.* Robust and Scalable Angiogenesis Assay of Perfused 3D Human iPSC-Derived Endothelium for Anti-Angiogenic Drug Screening. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 4804 (2020).
147. van Duinen, V. *et al.* Standardized and Scalable Assay to Study Perfused 3D Angiogenic Sprouting of iPSC-derived Endothelial Cells In Vitro. *JoVE J. Vis. Exp.* e59678 (2019) doi:10.3791/59678.
148. Hachey, S. J. *et al.* An in vitro vascularized micro-tumor model of human colorectal cancer recapitulates in vivo responses to standard-of-care therapy. *Lab. Chip* (2021) doi:10.1039/D0LC01216E.
149. Akinbote, A. *et al.* *Front. Physiol.* **0**, (2021).
150. Qian, Z. *et al.* In Situ Visualization and SERS Monitoring of the Interaction between Tumor and Endothelial Cells Using 3D Microfluidic Networks. *ACS Sens.* **5**, 208–216 (2020).
151. Gliberman, A. L. *et al.* Synchronized stimulation and continuous insulin sensing in a microfluidic human Islet on a Chip designed for scalable manufacturing. *Lab. Chip* **19**, 2993–3010 (2019).
152. Hsu, H.-H. *et al.* Study 3D Endothelial Cell Network Formation under Various Oxygen Microenvironment and Hydrogel Composition Combinations Using Upside-Down Microfluidic Devices. *Small* **17**, 2006091 (2021).
153. Chen, L.-J., Raut, B., Nagai, N., Abe, T. & Kaji, H. Prototyping a Versatile Two-Layer Multi-Channel Microfluidic Device for Direct-Contact Cell-Vessel Co-Culture. *Micromachines* **11**, 79 (2020).
154. Ewart, L. & Roth, A. Opportunities and challenges with microphysiological systems: a pharma end-user perspective. *Nat. Rev. Drug Discov.* **20**, 327–328 (2021).
155. Nikolaev, M. *et al.* Homeostatic mini-intestines through scaffold-guided organoid morphogenesis. *Nature* **585**, 574–578 (2020).
156. Lee, S. *et al.* Microfluidic-based vascularized microphysiological systems. *Lab. Chip* **18**, 2686–2709 (2018).

Chapitre 2 : Plateforme microfluidique innovante pour la perfusion d'organoïdes- sur-puce

Chapitre 2

Chapitre 2 : Plateforme microfluidique innovante pour la perfusion d'organoïdes-sur-puce	53
1 Introduction.....	55
2 Brique élémentaire du circuit microfluidique proposé.....	57
2.1 Dimensionnement du circuit microfluidique, simplification du contrôle des écoulements.	59
2.2 Caractérisation géométrique de l'unité de piégeage des sphéroïdes / organoïdes	60
2.2.1 Règles de dimensionnement géométrique du piège	61
2.2.2 Unités de piégeage multiples, mise en série.....	65
2.3 Exploitation de l'architecture en serpentin pour les organes-sur-puces vascularisés.....	66
3 Procédé d'injection innovant dans le dispositif microfluidique choisi.....	66
3.1 Méthode originale et robuste d'encapsulation permanente de sphéroïdes	66
3.1.1 Généralités	66
3.1.2 Caractéristiques du dispositif microfluidique.....	67
3.1.3 Mise en œuvre du système	67
3.1.4 Autres modes de réalisation possibles.....	72
3.2 Vascularisation	75
4 Evaluation des paramètres de contrôle du dépôt du gel dans le canal microfluidique.....	80
4.1 Observation du dépôt de gel dans les coins et sur les parois du canal microfluidique	80
4.2 Présentation d'une approche fondamentale	81
Annexe A	85
Choix du matériau	85
Conception et usinage des puces microfluidiques.....	85
Annexe B.....	87
Bibliographie.....	88

1 Introduction

Pour réaliser la perfusion microfluidique d'organes-sur-puce vascularisés, une approche générale a été formulée (voir Chapitre 1) dans laquelle un canal central constitué d'un hydrogel (porteur de cellules endothéliales, de cellules support et éventuellement d'un sphéroïde), est perfusé par l'intermédiaire de deux canaux latéraux dans lesquels circule le milieu de culture (Fig. 1). Notons qu'ici et dans la suite, par soucis de simplicité, le terme sphéroïde garde ici un sens général et désigne un agrégat 3D de cellules. La chambre centrale est séparée des canaux latéraux de perfusion par un muret ou des piliers. L'avantage de cette configuration est de permettre le maintien du sphéroïde au sein d'un environnement gélifié qui mime la matrice extracellulaire environnant les cellules *in vivo* et qui par ailleurs permet d'induire une vascularisation. Le Chapitre 1 a souligné la relative complexité du contrôle des écoulements dans les organes-sur-puce vascularisés dans cette architecture dite « classique ». Notamment, un tel dispositif n'est pas automatisé puisqu'il est nécessaire d'injecter le gel porteur du sphéroïde manuellement, à l'aide d'une pipette. C'est à l'expérimentateur de déterminer le moment à partir duquel il doit stopper l'injection afin d'éviter les débordements dans les canaux latéraux. Cette opération est délicate car il faut trouver un compromis entre une injection trop lente qui favoriserait la réticulation du gel avant le remplissage total du canal central, et une injection trop rapide qui favoriserait le débordement du gel dans les canaux latéraux. Le milieu de culture est injecté dans un second temps, après réticulation complète du gel, par l'intermédiaire d'autres entrées fluidiques, compliquant ainsi l'architecture fluidique.

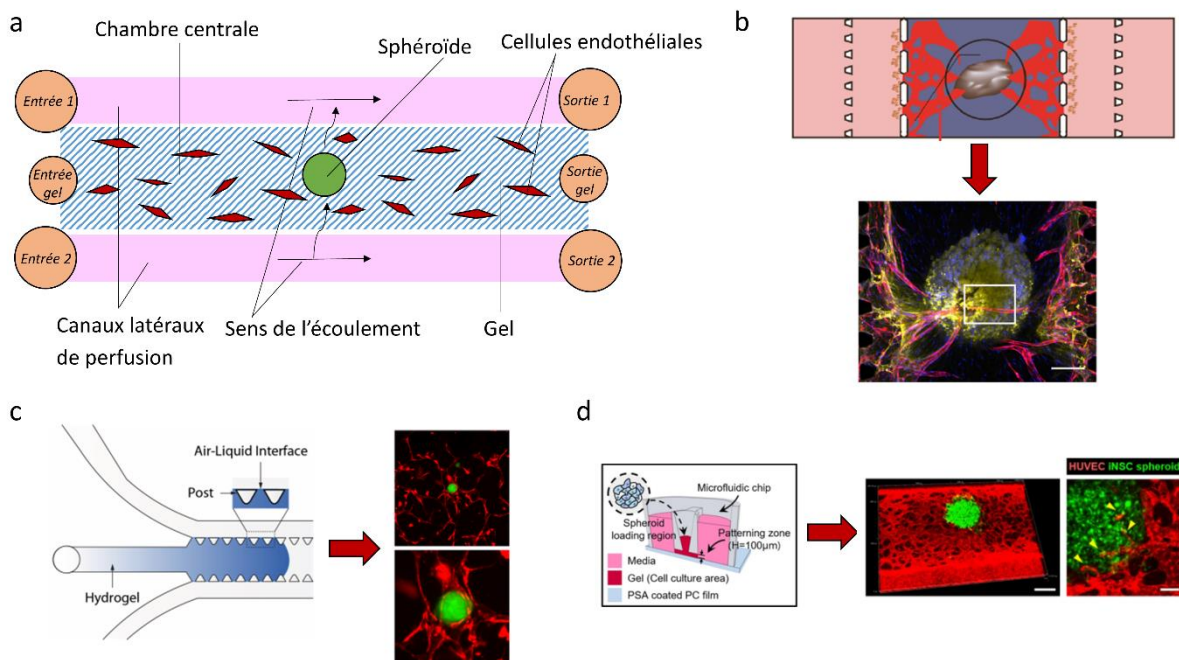


Figure 1 : **a.** Représentation schématique de l'architecture classiquement utilisée pour la perfusion de sphéroïdes / organoïdes vascularisés sur puce. Pour des raisons de clarté, les cellules support ne sont pas représentées, **b-d.** Exemples de sphéroïdes vascularisés sur puce à partir de l'architecture classique que l'on retrouve dans la littérature scientifique, adaptés de Nashimoto et al.¹ (**b**), Rambol et al.² (**c**) et Shin et al.³ (**d**).

Une deuxième approche concernant la perfusion microfluidique de sphéroïdes vise en priorité à contrôler la localisation du sphéroïde. Le sphéroïde est injecté à travers une entrée fluïdique et se retrouve piégé par des contraintes hydrodynamiques à un endroit du dispositif microfluidique, choisi par le concepteur. Dans l'exemple de la figure 2 le sphéroïde est contraint de basculer au sein d'un canal traversant qui est conçu comme court-circuit ou bipasse (de l'anglais bypass) d'une boucle (schématisée par une flèche) assignée au canal de perfusion.

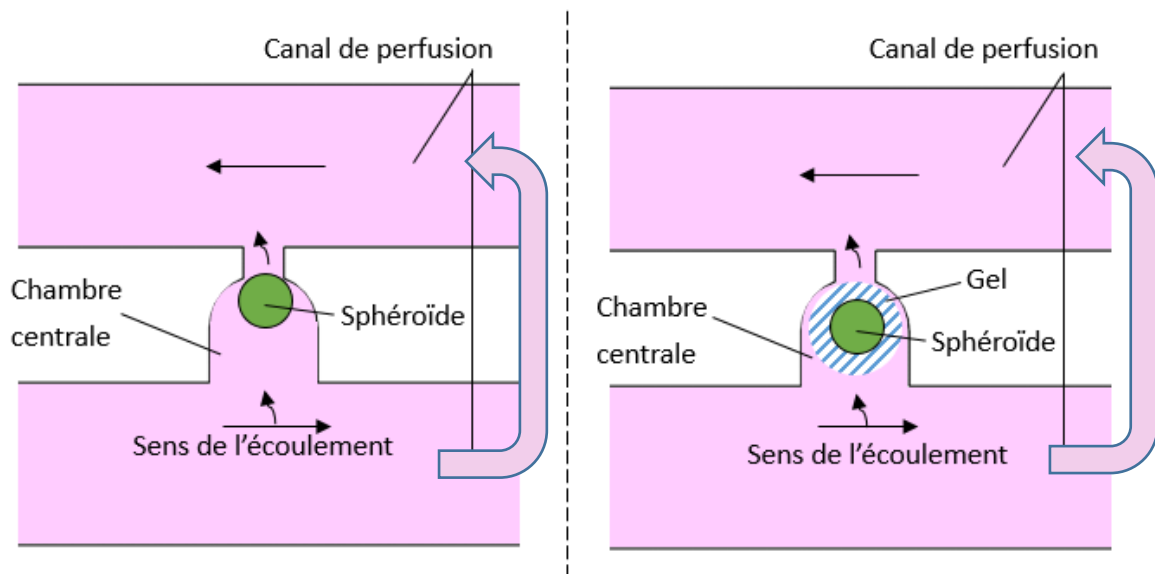


Figure 2 : Canal court-circuitant une boucle (schématisée par une flèche) du canal de perfusion, qui peut être utilisé pour des sphéroïdes baignant dans le milieu (à gauche), ou préalablement encapsulés dans des billes de gel (à droite).

Le sphéroïde se retrouve ainsi piégé face à une restriction qui termine le canal traversant et dont la taille caractéristique est inférieure au diamètre du sphéroïde. Un flux continu reprenant le chemin de la boucle peut alors être appliqué pour maintenir le sphéroïde sous perfusion. Dans la littérature scientifique, le sphéroïde peut baigner directement dans le milieu de culture^{4,5} (Fig. 2 à gauche) ou encapsulé dans une bille de gel⁶ (Fig. 2 à droite) ; l'encapsulation est alors généralement réalisée dans un autre dispositif microfluidique en amont. Dans les deux cas, aucune liaison chimique ne peut se développer entre les parois des canaux et le gel. Ainsi le sphéroïde et son environnement ne sont pas figés dans la puce et sont soumis à des fluctuations qui empêchent toute vascularisation.

Pour remédier aux inconvénients évoqués ci-dessus, le dispositif présenté dans cette étude intègre au sein d'un même composant microfluidique, une étape de piégeage (ou localisation) et une étape d'encapsulation qui sont aisément contrôlables. Il permet enfin la vascularisation sur puce de sphéroïdes ou d'organoïdes, de façon robuste et simplifiée par rapport aux méthodes classiques décrites au Chapitre 1. Ce dispositif combine ainsi :

- un circuit microfluidique assurant l' **étape de piégeage** (ou localisation) de l'organoïde via sur lequel se greffe,
- un système d'injection innovant assurant une **étape d'encapsulation** de l'organoïde.

Le dispositif résultant permet enfin l' **étape de vascularisation** finale *via* divers modes de création d'un réseau endothélial autour du sphéroïde encapsulé et piégé. Ces trois étapes vont être successivement décrites dans les sections suivantes.

2 Brique élémentaire du circuit microfluidique proposé

Le circuit microfluidique est constitué d'un canal en serpentin, court-circuité par un canal traversant, convergeant en forme de U et débouchant sur la partie rectiligne avale du canal par une forte restriction de taille caractéristique inférieure à celle de l'objet biologique que l'on souhaite piéger. Dans la suite, on dénommera ce canal traversant « bipasse », « raccourci » ou « piège ». Cette architecture, déjà décrite dans la littérature⁷, permet ainsi de localiser automatiquement des cellules uniques⁸, des sphéroïdes de cancer⁵ ou encore des îlots pancréatiques^{4,6,9,10} (Fig. 3).

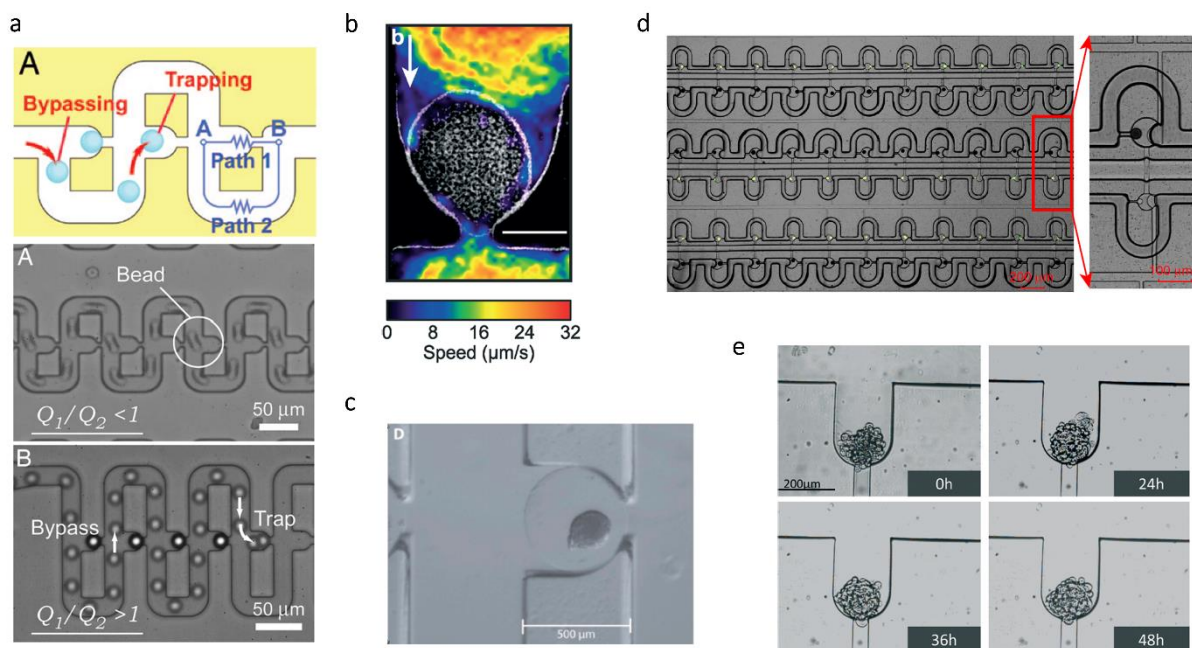


Figure 3 : Quelques exemples d'utilisation de l'architecture en serpentin dans la littérature scientifique. **a.** Schéma de principe initialement proposé par Tan et Takeuchi⁷, et validation expérimentale avec des billes, **b.** Etude de l'influence de l'écoulement sur la viabilité d'îlots pancréatiques par Silva et al.⁴, **c.** Etude d'îlots pancréatiques préalablement encapsulés par Nourmohammadzadeh et al.⁶, **d.** Séquençage d'ARN messenger de cellules uniques dans l'architecture en serpentin par Zhang et al.⁸ **e.** Etude de l'évolution de sphéroïdes de cancer par Ruppen et al.⁵.

Afin de vérifier la compatibilité de cette architecture microfluidique avec les méthodes de fabrications du laboratoire et avec les sphéroïdes biologiques avec lesquels nous voulions travailler, des premières expérimentations ont été conduites sur des puces microfluidiques aux dimensions variées (Figure 4a). Nous avons ainsi pu valider le piégeage hydrodynamique dans cette architecture en serpentin à la fois d'un point de vue fluide (avec des billes en polystyrène, Figure 4b) et d'un point de vue biologique (avec divers sphéroïdes, Figure 4c). Les sphéroïdes, facilement déformables, peuvent ainsi être délicatement piégés dans la zone en U, sans déformation apparente. Pour ces expériences de pré-validation, une large gamme de débit a été testée (de 100 $\mu\text{l}/\text{min}$ à 1000 $\mu\text{l}/\text{min}$) pour laquelle le piégeage hydrodynamique fonctionne. La grande efficacité de piégeage observée sur ces expériences préliminaires, comparé à d'autres principes de piégeages testés (non présentés ici) nous a motivé à choisir ce principe pour les travaux de thèse.

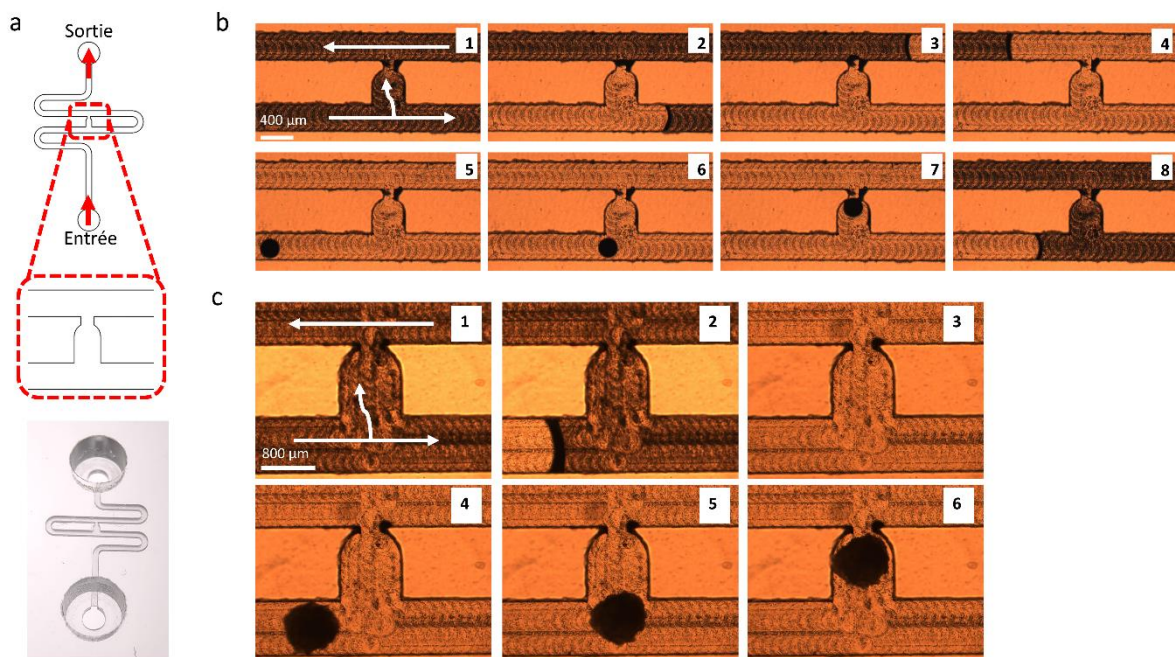


Figure 4 : Pré-validation de l'architecture en serpentin. **a**. Schéma de l'architecture globale du circuit microfluidique (haut) et photographie de la réalisation expérimentale dudit circuit (bas), **b-c**. Validations expérimentales du piégeage hydrodynamique avec une bille de polystyrène (a) et un organoïde de vaisseaux sanguins (b). Le sens de l'écoulement est indiqué par les flèches blanches.

2.1 Dimensionnement du circuit microfluidique, simplification du contrôle des écoulements

La puce microfluidique :

Le dispositif final présenté ne comprend qu'en tout et pour tout une entrée et une sortie fluidique. Afin de travailler avec des agrégats de cellules de 300 μm de diamètre environ, le canal microfluidique présente une section carrée de 400 μm de côté. Il s'étend le long d'un circuit constitué d'un canal en serpentin de largeur w_A et de hauteur h , décrivant une série de coudes reliés par des tronçons de transition rectilignes et parallèles. La figure 3 représente une version élémentaire de ce circuit comptant trois coudes (ou boucles). La boucle médiane est conformément à ce qui avait été annoncé plus haut, court-circuitée par un canal traversant, appelé bipasse ou raccourci dans la suite. Ce bipasse, a une forme de convergent rectiligne qui s'achève par une restriction ; sa section rectangulaire possède une largeur initiale w_I , et une largeur finale w_B , la hauteur h étant commune avec celle du reste du circuit. L'architecture de ce circuit microfluidique permet en effet de piéger, et donc de localiser automatiquement les organoïdes.

Le couple formé par le bipasse et par la boucle peut être considéré comme une unité de piégeage. Ses caractéristiques géométriques seront précisées dans la suite. Quelques dimensions du circuit microfluidique modifié par le bipasse peuvent toutefois être déjà fixées compte tenu de la taille des objets biologiques étudiés, typiquement de quelques centaines de micromètres. Ainsi dans les expériences avec des sphéroïdes modèles (cf. Chapitre 3) ou des îlots pancréatiques (cf. Chapitre 4) de 300 μm de diamètre environ, la figure 3a montre qu'un canal de section carré, tel que $w_A = h = 400 \mu\text{m}$, a été adopté. Un canal de section carrée de côté $h = 800 \mu\text{m}$ a en revanche été utilisé pour les organoïdes de vaisseaux sanguins (cf. Chapitre 3), qui font environ 600 μm de diamètre. Comme indiqué dans la sous-section 2.2 suivante, on distinguera les paramètres dont la valeur peut être fixée *a priori* et ceux dont la valeur résulte d'un bon fonctionnement de l'unité de piégeage.

Pour conclure sur l'architecture du circuit microfluidique proposé, nous donnons ici quelques données techniques qui sont détaillées en Annexe A. Les microcanaux sont usinés dans une plaque de COC de quelques millimètres d'épaisseur et communiquent avec les entrées et sorties fluidiques *via* des trous débouchant au format luer. La face dite « arrière » sur laquelle les microcanaux sont usinés est alors fermée par un film adhésif MicroAmp™ transparent (collage par pression).

Le contrôle des écoulements :

En entrée de chaque circuit, une seringue coupée et connectée à l'entrée du circuit microfluidique *via* une connexion type luer standard, joue le rôle de réservoir pour l'introduction des différents liquides. L'écoulement est généré par un pousse-seringue placé en sortie du circuit et fonctionnant en mode aspiration. Avec un pousse-seringue 10 voies, 10

circuits microfluidiques peuvent être pilotés en parallèle (Fig. 5c). Le choix du pousse-seringue en sortie du circuit a été fait suivant les raisons évoquées au Chapitre 1, Partie 2, section 3. Par rapport à une source de pression en amont du circuit, qui nécessite d'être connectée au réseau d'air comprimé, le pousse seringue est peu encombrant et peut être placé directement dans l'incubateur. Par ailleurs, afin de reproduire les cisaillements physiologiques dans notre culture sur puce, il est nécessaire de contrôler l'écoulement en débit plutôt qu'en pression. Enfin, l'utilisation d'un pousse-seringue en mode aspiration permet de limiter le risque de contamination. En effet, de petites quantités de milieu de culture peuvent être placées et renouvelées régulièrement dans les réservoirs d'entrée ; elles sont ensuite continuellement aspirées vers les seringues de sortie. Les expériences peuvent ainsi être conduites sur le long-terme (jusqu'à 20 jours) sans avoir à déconnecter les circuits microfluidiques. Les risques d'introduction de bulles d'air ou de surpression au sein des circuits microfluidiques sont donc réduits. La puce avec son réservoir amont peut être placée dans l'enceinte de culture et le pousse-seringue à l'extérieur, ce qui permet de maintenir le milieu de culture oxygéné en permanence.

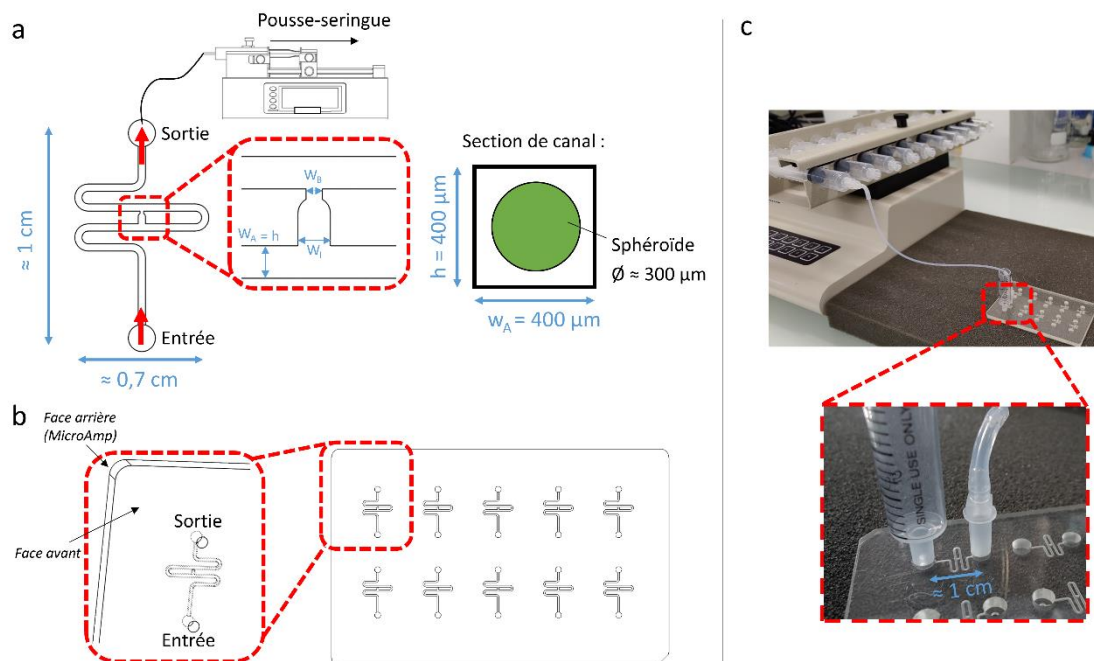


Figure 5 : **a.** Schéma de la plateforme microfluidique dans son ensemble, **b.** Vue de dessus de la puce microfluidique comprenant 10 circuits pouvant être pilotés en parallèle, **c.** Photos du dispositif expérimental où, pour des raisons de clarté, seul un circuit microfluidique est connecté au pousse-seringue 10 voies.

2.2 Caractérisation géométrique de l'unité de piégeage des sphéroïdes / organoïdes

Le principal atout de cette architecture réside dans la localisation automatisée du sphéroïde. Ce système de localisation, repose sur un piégeage de nature hydrodynamique du sphéroïde. Exposons ici son principe de fonctionnement.

2.2.1 Règles de dimensionnement géométrique du piège

Lorsque le sphéroïde arrive au niveau de l'unité de piégeage, deux possibilités s'offrent à lui (Fig. 6). Soit le contournement du piège par le chemin A, auquel cas le sphéroïde n'est pas piégé et se dirige vers la sortie. Soit le raccourci par le chemin B, auquel cas le sphéroïde est piégé dans la zone adéquate. Pour que le principe de piégeage hydrodynamique fonctionne, il faut que le sphéroïde privilégie le chemin B ; le circuit microfluidique doit ainsi respecter globalement certaines contraintes géométriques qui vont être détaillées.

Considérons les points X et Y à l'intersection respectivement en amont et aval du bipasse. La différence de pression entre X et Y en passant par la boucle (chemin A) de longueur L_A , sera notée ΔP_A et la différence de pression en passant par le bipasse (chemin B), dont la restriction est de longueur L_B , sera notée ΔP_B . Ces différences de pression ne dépendent pas du chemin suivi et sont les mêmes. C'est en revanche le rapport des débits Q_A et Q_B qui va conditionner le bon fonctionnement de l'unité de piégeage.

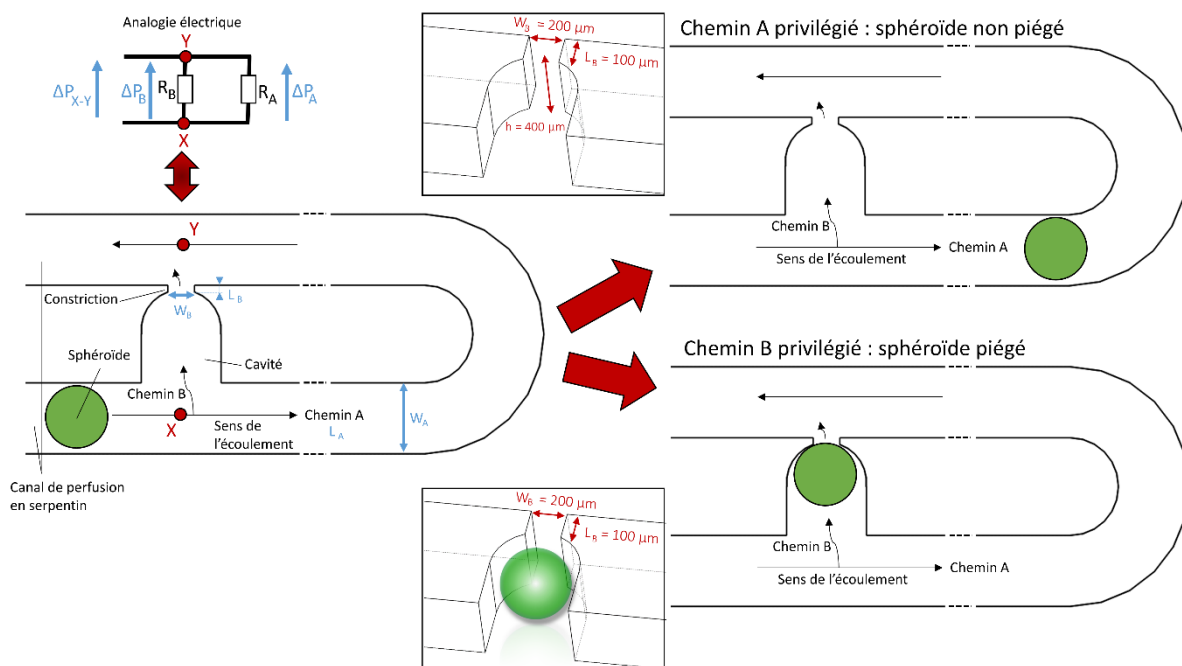


Figure 6 : Unité de piégeage du sphéroïde et zoom sur le bipasse.

Pour évaluer approximativement le rapport de ces débits, il faut estimer les différences de pression, résultant des pertes de charges le long de chacun des chemins. Une hypothèse commune, classique dans les systèmes microfluidiques, qui est de négliger les aspects inertiels et donc de supposer les écoulements rampants (régime de Stokes), sera adoptée. Ensuite, comme il n'est pas justifié de s'engager dans une simulation numérique fine des champs de pression au sein de cette unité de piégeage, dont la géométrie est assez complexe, il sera fait appel à des corrélations disponibles dans la littérature scientifique, qui se rapprochent autant

que possible de la géométrie des canaux relatifs aux deux chemins. Au préalable les hypothèses simplificatrices suivantes, communes aux pertes de charge le long des deux chemins, seront introduites :

- On négligera les pertes de charges associées au branchement en T (séparation des courants) autour du point X .
- On négligera les pertes de charges associées à la bifurcation (réunion des courants) autour du point Y .
- On néglige la présence du sphéroïde transporté par le flux dans le calcul des pertes de charges.

Pour des écoulements rampants, dans les microcanaux, les différences de pression qui se manifestent sont des fonctions linéaires du débit des liquides. Les microcanaux ont des sections rectangulaires qui induisent des pertes de charge régulières de la forme¹¹ :

$$\Delta P = \frac{(w + h)^2}{2w^3h^3} P_0 \mu L Q \quad (1)$$

Où μ est la viscosité dynamique du liquide, w , L et h la largeur, la longueur et la hauteur respectivement du canal considéré. P_0 est un nombre de Poiseuille caractéristique de la géométrie de la section du canal rectangulaire considéré. Différents modèles approchés de P_0 , résultant d'une résolution analytique fondée sur des développements en séries, sont disponibles dans la littérature. On choisira l'expression de P_0 en fonction du rapport d'aspect $\alpha = \frac{h}{w}$ qui est fournie par Shah et London¹² :

$$P_0 = 24(1 - 1,3553 \alpha + 1,9467 \alpha^2 - 1,7012 \alpha^3 + 0,9564 \alpha^4 - 0,2537 \alpha^5) \quad (2)$$

Dans le cas du chemin A, la section du canal est carrée, ainsi $\alpha_A = 1$ et $P_{0A} = 14,2296$, et la différence de pression s'écrit (en négligeant le surcroît de perte de charge associé à la courbure du coude) :

$$\Delta P_A = \frac{2 P_{0A}}{h^3} \mu Q_A \frac{L_A}{h} \quad (3)$$

La différence de pression ΔP_B le long du chemin B sera considérée comme résultant essentiellement de la restriction. Elle est composée d'une composante régulière, due au frottement de l'écoulement le long des parois latérales de la restriction de longueur L_B , et d'une composante singulière liée au changement de section de l'écoulement à l'entrée et à la sortie de la restriction (contraction / expansion).

Concernant la composante régulière, il faut tenir compte dans l'évaluation de P_{0B} de l'étranglement de w_B par rapport à h ; cette étroitesse est nécessaire pour bloquer un sphéroïde engagé dans le bipasse, condition évoquée plus haut. Ainsi le rapport d'aspect $\alpha_B = \frac{h}{w_B}$ devient

supérieur à l'unité, mais le modèle proposé par Shah et London peut toujours être choisi à condition de permuter la largeur et la hauteur, la gravité ne jouant aucun rôle à ces échelles. Ainsi en remplaçant α par α_B^{-1} dans (2) pour l'expression de P_{O_B} on peut écrire l'expression de la différence de pression régulière associée au chemin B :

$$\Delta P_{B_R} = \frac{\left(1 + \frac{w_B}{h}\right)^2 P_{O_B}}{2w_B^3} \mu Q_B \frac{L_B}{h} \quad (4)$$

L'évaluation de la composante singulière est délicate car il n'existe pas dans la littérature de modèle correspondant à notre géométrie particulière. On s'appuiera sur l'étude numérique de Zivkovic et al.¹³. En particulier, les auteurs ont fait varier le rapport d'aspect de la restriction $\frac{w_B}{h}$ et la largeur w_I (entrée du bipasse). Les conclusions de leurs réflexions seront adoptées ici ; elles conduisent à la différence de pression singulière suivante :

$$\Delta P_{B_S} = \frac{(1 - \gamma_B) K}{w_B^2 h} \mu Q_B \quad (5)$$

Où l'on a introduit $\gamma_B = \frac{w_B}{w_I}$ le rapport de contraction du raccourci et K , un coefficient qui traduit le seul effet du rapport d'aspect. Dans notre cas on retiendra :

$$K = \begin{cases} 9,70 + 18 \left(\frac{w_B}{h}\right)^{1,1} & , \quad 0,33 < \frac{w_B}{h} < 0,8 \\ 10,15 & , \quad \frac{w_B}{h} < 0,33 \end{cases} \quad (6)$$

Puisque la différence de pression entre les points X et Y représentés en figure 6 ne dépend pas du chemin suivi, on a $\Delta P_A = \Delta P_B = \Delta P_{B_R} + \Delta P_{B_S}$ ce qui se traduit par :

$$\frac{2 P_{O_A}}{h^3} \mu Q_A \frac{L_A}{h} = \frac{\left(1 + \frac{w_B}{h}\right)^2 P_{O_B}}{2w_B^3} \mu Q_B \frac{L_B}{h} + \frac{(1 - \gamma_B) K}{w_B^2 h} \mu Q_B \quad (7)$$

Soit :

$$\frac{Q_A}{Q_B} = 0,035 \frac{h}{L_A} \left(\frac{h}{w_B}\right)^3 \left[\frac{1}{2} \left(1 + \frac{w_B}{h}\right)^2 P_{O_B} \frac{L_B}{h} + K (1 - \gamma_B) \frac{w_B}{h} \right] \quad (8)$$

Le piège fonctionne lorsque le sphéroïde privilégie le chemin B comme indiqué plus haut. Il faut pour cela que $\frac{Q_A}{Q_B} \lesssim 1$, condition qui ne dépend que des paramètres géométriques de l'unité de piégeage comme le montre la relation (8). Parmi ces paramètres, certains sont fixés par la taille des sphéroïdes considérés ; ainsi h , w_A et w_I doivent être légèrement supérieures au diamètre du sphéroïde pour qu'il puisse à la fois être introduit dans le canal sans être déformé, basculer dans la partie convergente du bipasse et ensuite obstruer la restriction. De plus, L_B doit être suffisamment petite pour ne pas coincer une bulle d'air par capillarité dans la restriction lors du remplissage.

Il reste à déterminer L_A et w_B pour que le piège fonctionne. Ce sont les deux paramètres géométriques sur lesquels nous pouvons jouer pour dimensionner le circuit microfluidique. La figure 7 représente la fonction $\frac{Q_A}{Q_B} = f\left(\frac{L_A}{h}, \frac{w_B}{h}\right)$. Ainsi toute la surface associée à $\frac{Q_A}{Q_B} < 1$ (bleu foncé et bleu clair) correspond à un jeu de paramètres compatible avec le système de piégeage. Au contraire, la surface associée à $\frac{Q_A}{Q_B} > 1$ (orange et jaune) permet de visualiser les situations qui ne garantissent pas le fonctionnement du piège. Par exemple, à L_A fixé, plus w_B devient faible, et plus le rapport des débits se rapproche de l'unité, puisque la perte de charge associée à la restriction grandit. Pareillement à w_B fixé, plus L_A devient faible et plus le rapport des débits se rapproche de l'unité, puisque la perte de charge associée à la boucle diminue.

Il convient de noter que trop s'éloigner de la ligne $Q_A = Q_B$ comporte un risque dans une mise en série des unités de piégeage telle que définie en figure 8. En effet, une fois un sphéroïde engagé dans le bipasse, l'écoulement traversant continue de se faire au-dessus du sphéroïde qui ne bloque pas toute la hauteur de la restriction. Si même après piégeage du sphéroïde, l'inégalité $\frac{Q_A}{Q_B} < 1$ subsiste, un second sphéroïde peut alors être piégé dans la même unité que le premier. Il est ainsi préférable de choisir L_A et w_B de sorte que $\frac{Q_A}{Q_B}$ soit légèrement inférieur à l'unité ; ainsi l'inégalité se retrouve facilement renversée après piégeage d'un sphéroïde et l'écoulement est alors redirigé prioritairement vers le chemin A.

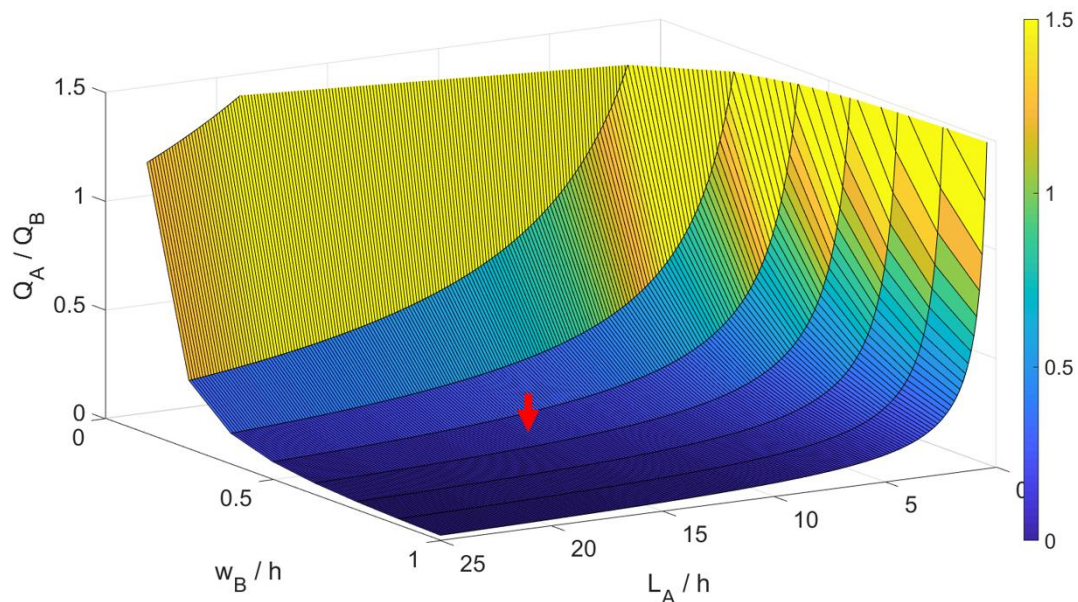


Figure 7 : Surface Q_A/Q_B en fonction de L_A/h et w_B/h (dans le cas d'un circuit dimensionné avec $w_A = h = 400 \mu\text{m}$). La flèche rouge indique les paramètres géométriques choisis en pratique. Le code Matlab qui permet de le tracé et la visualisation 3D de cette surface est donné en Annexe B.

A titre d'exemple, les dimensions qui ont été choisies en pratique sont données dans le tableau ci-dessous :

	L_A/h	W_I/h	W_B/h	L_B/h	h	Q_A/Q_B
Sphéroïdes (300 μm)	18,55	1,25	0,5	0,25	400	0,11
Organoïdes (600 μm)	17,175	1,125	0,375	0,125	800	0,18

2.2.2 Unités de piégeage multiples, mise en série

Cette architecture est simple à paralléliser grâce à la mise en série de l'unité de piégeage présentée ci-dessus. On peut alors déposer plusieurs sphéroïdes dans le réservoir d'entrée et initier l'injection dans le circuit microfluidique. Dans ce cas, lorsque le premier sphéroïde va se piéger dans la première cavité, il va obstruer la majeure partie de la section de passage dans la restriction, induisant une forte perte de charge dans le chemin B. Au niveau de la première cavité, le chemin A sera alors privilégié par le deuxième sphéroïde, qui ira se loger dans la deuxième cavité, et ainsi de suite. Une validation expérimentale avec des billes de diamètre 315 μm est donnée en Fig. 8d.

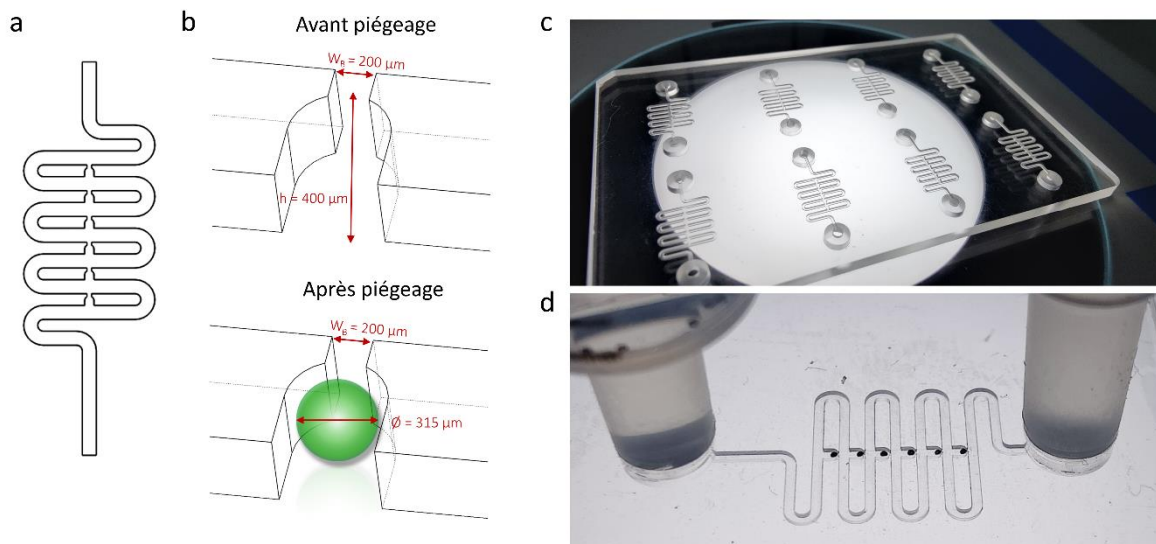


Figure 8 : **a.** Schéma de la mise en série de l'unité de piégeage avec 6 pièges ici, **b.** Zoom sur la cavité avant et après piégeage, **c.** Photo de la puce microfluidique comprenant 8 circuits pouvant être pilotés en parallèle, **d.** Photo d'un circuit microfluidique dans lequel 6 billes (noires, polystyrène) ont été piégées les unes à la suite des autres.

2.3 Exploitation de l'architecture en serpentin pour les organes-sur-puces vascularisés

Les nombreux atouts de l'architecture en serpentin précédemment évoqués nous ont conduit à choisir de développer un système d'organe-sur-puce à partir de celle-ci. Néanmoins, un travail pour adapter cette architecture pour répondre aux objectifs de vascularisation a été nécessaire et constitue un point clé de cette thèse. En effet, en ce qui concerne les organes-sur-puce vascularisés, il est nécessaire de faire cohabiter deux phases au sein de la puce microfluidique : une phase gélifiée support de la vascularisation, et une phase liquide (le milieu de culture) pour apporter aux cellules les nutriments nécessaires à leur bon développement. Or, dans la présentation ci-dessus, seule une phase liquide a été prise en compte. Dans ce cas, le développement d'un réseau vasculaire tri-dimensionnel autour du sphéroïde étudié n'est pas possible. Un procédé d'injection innovant a ainsi été mis au point, afin de retrouver de façon schématique, la configuration classique au sein de l'architecture en serpentin. C'est l'objet de la section qui suit. Ce procédé, couplé au dispositif expérimental, a fait l'objet d'un dépôt de brevet¹⁴, et constitue les fondations de cette thèse en répondant à la problématique suivante : comment adapter l'architecture en serpentin à la mise en culture d'un organe-sur-puce vascularisé ?

3 Procédé d'injection innovant dans le dispositif microfluidique choisi

3.1 Méthode originale et robuste d'encapsulation permanente de sphéroïdes

3.1.1 Généralités

En entrée du circuit, trois phases sont déposées dans le réservoir d'entrée :

- Phase 1 : Hydrogel (non polymérisé, c'est-à-dire à l'état liquide, en début d'expérience), porteur du sphéroïde.
- Phase 2 : Air,
- Phase 3 : Milieu de culture.

Les expériences ont été conduites avec des billes en polymère, des sphéroïdes de cellules de cancer de prostate (VCaP), des sphéroïdes mésenchymateux constitués de cellules HUVEC et fibroblastes (voir Chapitre 3 section 3.2) ainsi que des organoïdes de vaisseaux sanguins et de cœur produits à partir de cellules souches (voir Chapitre 3 section 3.4).

Le gel réticule *via* l'activation de différents mécanismes chimiques. Classiquement, l'interaction entre le fibrinogène et la thrombine permet cette réticulation pour la formation d'un hydrogel de fibrine : c'est ce type de gel qui a été utilisé dans ce travail. D'autres hydrogels biocompatibles peuvent être utilisés ; par exemple, une augmentation de température permet

la réticulation du collagène pour un gel ainsi constitué, alors qu'une illumination UV permet la réticulation d'autres hydrogels synthétiques.

3.1.2 Caractéristiques du dispositif microfluidique

Les dimensions du circuit microfluidique sont choisies par rapport à la taille des objets biologiques étudiés, typiquement de quelques centaines de micromètres. Dans les expériences, un canal de section $400\ \mu\text{m} \times 400\ \mu\text{m}$ a été utilisé pour les sphéroïdes modèles (voir Chapitre 3 section 3.2) et les îlots pancréatiques (voir Chapitre 4), et un canal de section $800\ \mu\text{m} \times 800\ \mu\text{m}$ a été utilisé pour les organoïdes (voir Chapitre 3 section 3.4). Comme expliqué précédemment, les caractéristiques géométriques du circuit microfluidique ont été choisies de façon à respecter les critères de piégeage précédemment détaillés. Plusieurs géométries sont ainsi envisageables, mais leurs dimensions doivent être choisies de sorte à respecter ces critères.

Le dispositif expérimental dans sa configuration initiale est schématisé en Fig. 9. La phase 1, constituée de l'hydrogel porteur du sphéroïde, est placée dans une seringue en entrée du circuit, jouant le rôle de réservoir. La phase 2 est donc simplement déterminée par l'air dans le réservoir au-dessus de la phase 1. La phase 3 n'est à ce stade pas prise en considération.

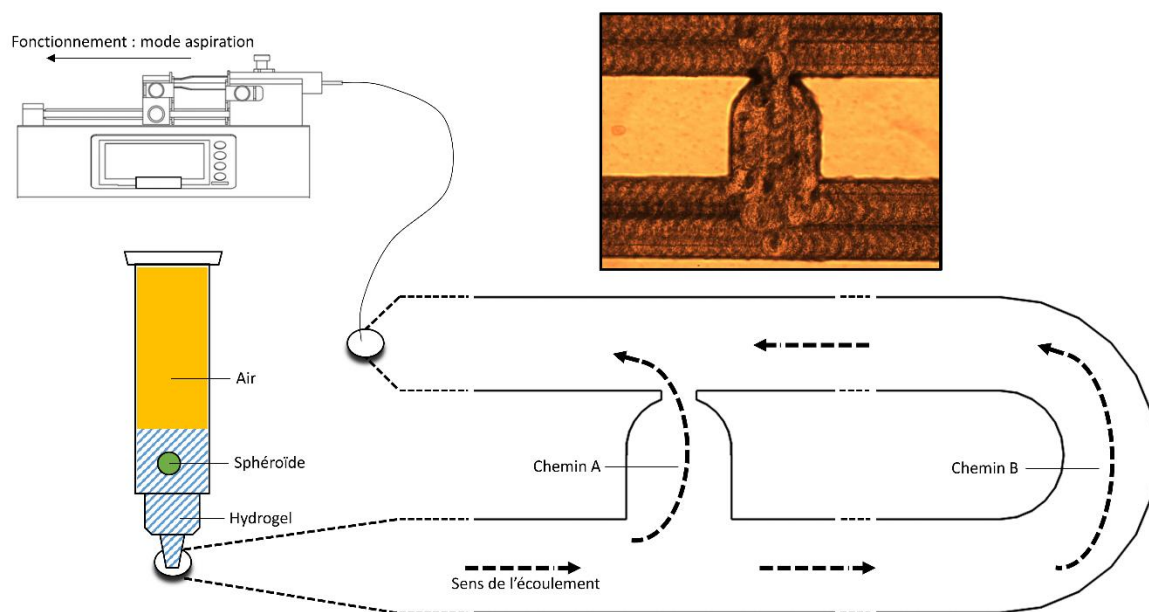


Figure 9 : Schéma de fonctionnement du dispositif microfluidique dans sa configuration initiale.

3.1.3 Mise en œuvre du système

La mise en œuvre sur l'unité du dispositif proposé en Fig. 9 comporte trois étapes successives A, B et C qui permettront de suivre l'évolution du circuit microfluidique. Pour chaque configuration, on donnera en Figure à la fois une vue schématique et une photographie de la réalisation expérimentale (avec ici un organoïde de vaisseaux sanguins). Pour des raisons de

différences d'indices optiques plus ou moins marquées, l'interface air / gel est facilement repérable, tandis que l'interface gel / milieu de culture est invisible à l'œil nu.

A) Piégeage du sphéroïde

Compte tenu des caractéristiques du circuit microfluidique proposé, la première étape consiste à injecter le gel porteur du sphéroïde grâce au pousse-seringue fonctionnant en mode aspiration. Le sphéroïde se retrouve ainsi piégé dans le bipasse selon les principes hydrodynamiques précédemment décrits. Le canal microfluidique est entièrement rempli par l'hydrogel (Fig. 10), encore liquide à ce stade de l'expérience (réticulation en quelques minutes).

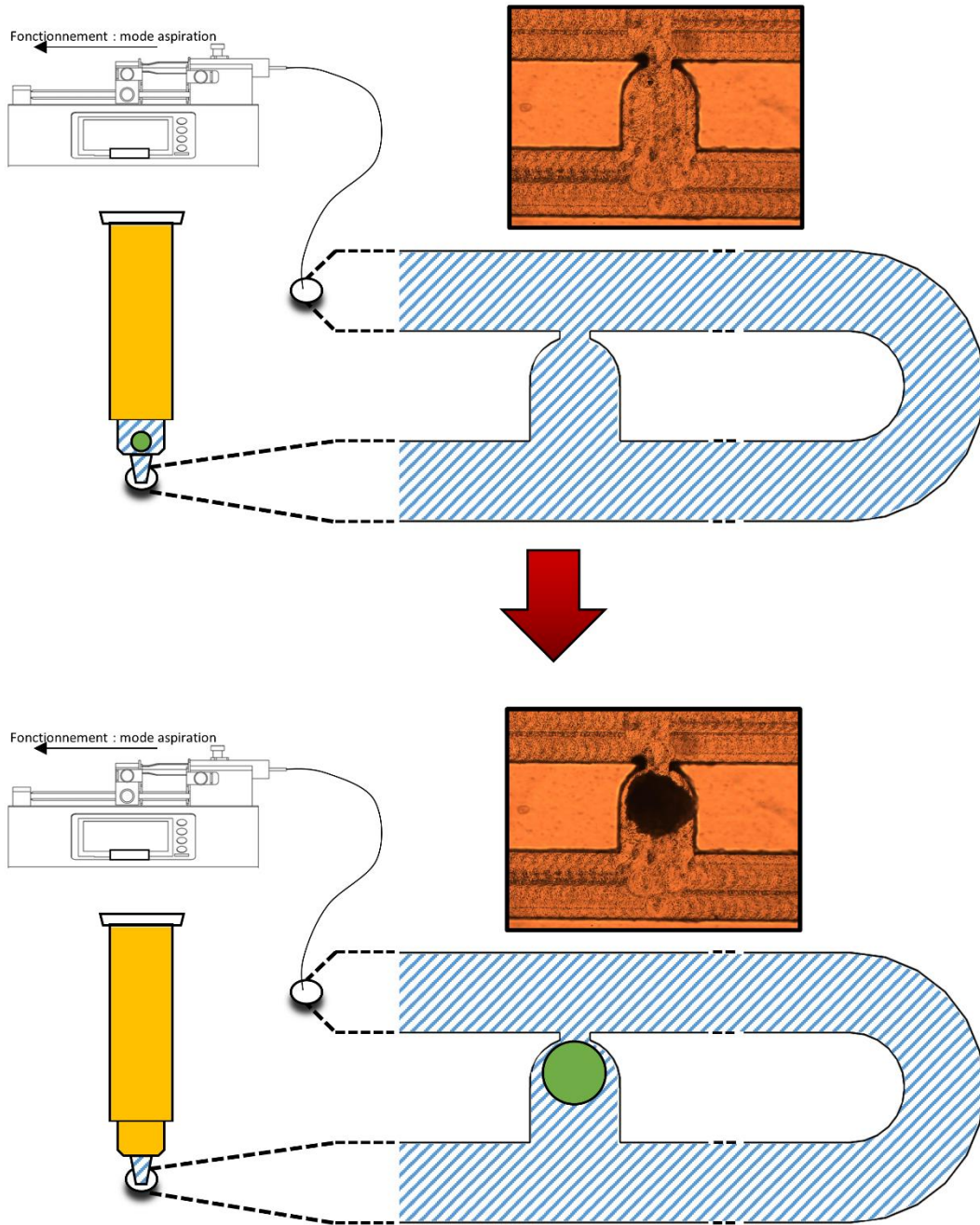


Figure 10 : Localisation du sphéroïde suspendu dans l'hydrogel grâce au système de piégeage hydrodynamique.

B) Localisation de l'environnement du sphéroïde

La deuxième étape permet de positionner stratégiquement l'environnement gélifié du sphéroïde en vue d'une perfusion, grâce à l'injection de la phase 2 (l'air). Cette étape suit immédiatement la première, si bien que le pousse-seringue fonctionne de façon continue pendant tout le procédé d'injection. En effet, lorsque tout le gel présent dans le réservoir a été

injecté dans le canal microfluidique, suit naturellement l'injection de l'air, qui remplit dès lors seul le réservoir.

Cette étape cruciale permet de pousser le gel vers la sortie, afin que celui-ci n'obstrue pas le passage du milieu de culture dans le canal principal. Par capillarité, il subsiste du gel sur les parois du canal ainsi que dans la cavité autour du sphéroïde, engendrant ainsi une interface gel / air le long du canal microfluidique. Cette interface est représentée vue en coupe dans une section de canal en Fig. 11 pour plus de clarté. Ce phénomène physique, qui s'avère être très robuste, fera l'objet d'une attention particulière dans la section 3 de ce chapitre.

Après quelques minutes, l'hydrogel de fibrine a réticulé (l'action de la thrombine sur le fibrinogène permet cette polymérisation). La configuration finale est adaptée à une perfusion microfluidique du sphéroïde fixé dans le gel et bordé par le canal principal laissé libre.

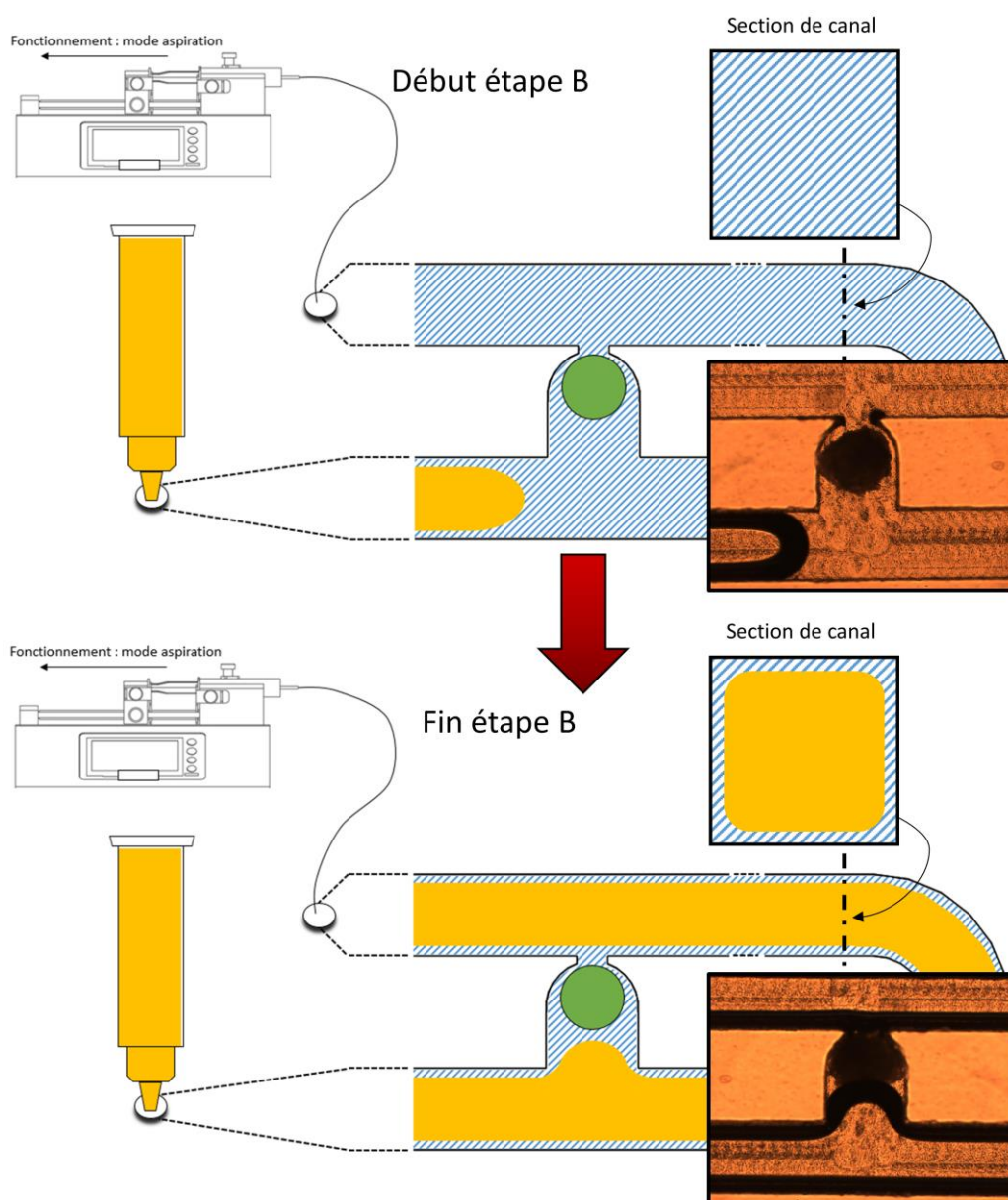


Figure 11 : Localisation du microenvironnement du sphéroïde par l'injection d'un doigt d'air.

C) Injection du milieu de culture

La dernière étape peut alors être réalisée en injectant le milieu de culture (phase 3) dans le circuit microfluidique. On dépose alors le milieu de culture dans le réservoir en entrée du circuit microfluidique (Fig. 12). Le milieu de culture est ainsi constamment oxygéné et assure la perfusion du sphéroïde sur le long terme, c'est-à-dire le temps de culture du sphéroïde sur puce souhaité par l'expérimentateur. La plateforme microfluidique est alors placée dans un incubateur à 37°C et 5% de CO₂.

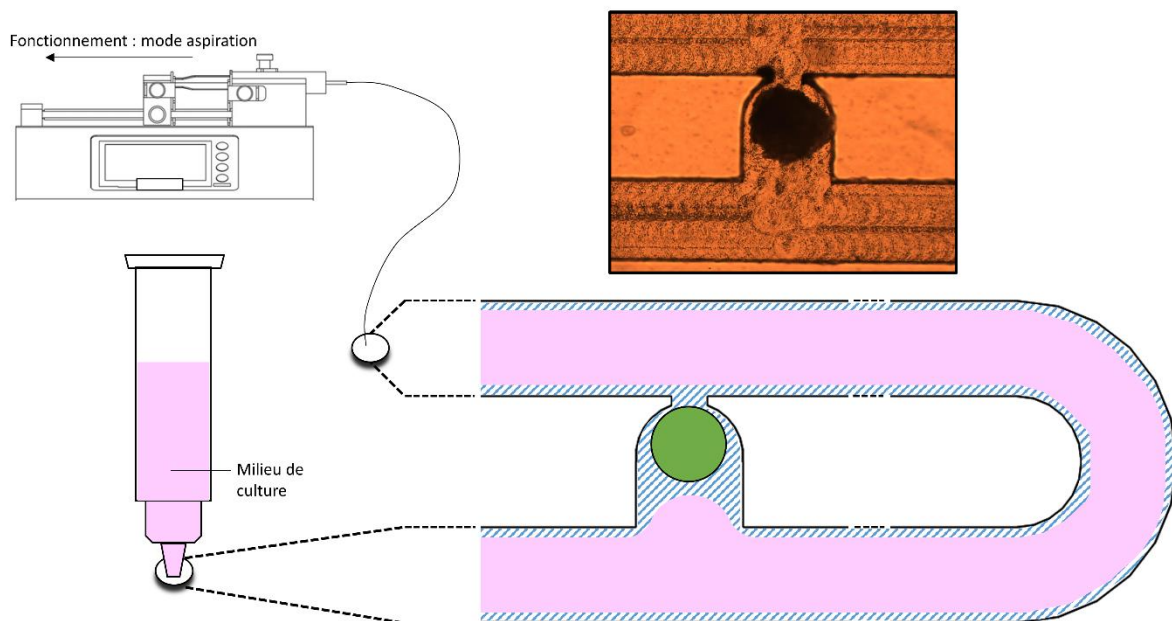


Figure 12 : Injection du milieu de culture dans le circuit microfluidique en vue d'une perfusion continue sur le long terme.

L'originalité de la solution proposée réside dans la localisation de l'environnement gélifié du sphéroïde qui se fait en injectant de l'air immédiatement après le piégeage du sphéroïde. Le gel non réticulé est aspiré vers la sortie du circuit. L'expérience montre que par capillarité, il demeure une fine couche de gel sur les parois des canaux. La zone de piégeage en forme de U est quant à elle obstruée par le gel. Après quelques minutes, le gel est réticulé et le sphéroïde figé dans la zone de piégeage. La perfusion du sphéroïde peut alors être réalisée en injectant le milieu de culture dans le canal microfluidique.

En définitive, cette méthode permet bien de retrouver la juxtaposition recherchée de l'hydrogel avec le milieu de culture. On reconnaît schématiquement la configuration dite classique, où une chambre centrale gélifiée est bordée par les canaux latéraux de perfusion. De plus, notre méthode offre la possibilité de localiser précisément un sphéroïde suspendu dans

l'hydrogel porteur. Cette solution répond aux défis lancés à la microfluidique par les industriels de par sa robustesse, sa répétabilité, son automatisation, sa rapidité d'exécution et sa facilité d'utilisation. Alors que les phénomènes capillaires et hydrodynamiques dans les systèmes classiques sont d'une maîtrise délicate, ils deviennent beaucoup plus contrôlables dans la présente architecture. Cette solution est donc d'utilisation plus aisée, y compris pour des utilisateurs non experts. Le dispositif permet de réaliser la préparation et la perfusion du sphéroïde de façon automatisée : entre la première et la dernière étape, l'expérimentateur intervient uniquement pour déposer dans le réservoir d'entrée le sphéroïde suspendu dans l'hydrogel, et le milieu de culture. Toutes ces étapes sont par ailleurs réalisées au sein d'un même composant microfluidique.

3.1.4 Autres modes de réalisation possibles

Le dispositif microfluidique tel qu'il a été utilisé expérimentalement vient d'être présenté. Or, ce mode de réalisation est une possibilité parmi d'autres.

Notons d'abord que le chemin B peut prendre une forme quelconque, dès lors que ses dimensions respectent le critère de piégeage $\frac{Q_A}{Q_B} < 1$. On peut donc le représenter sur schéma de principe de fonctionnement avec plus de généralité.

Pour une automatisation complète, c'est-à-dire si l'on veut éviter à l'expérimentateur les opérations de pipetage du sphéroïde (début étape A) et du milieu de culture dans le réservoir d'entrée (début d'étape C), on peut imaginer un système avec 3 réservoirs dans lesquels on dépose préalablement les trois phases précédemment décrites. Il suffit alors d'associer une vanne à chaque réservoir, que l'on ouvre à chaque début d'étape A, B et C, les deux autres vannes étant fermées (Fig. 13). Le Chapitre 4 montrera comment peuvent être réalisées et intégrées au circuit microfluidique de telles vannes. Notons que le réservoir 2 est superflu puisque l'injection de l'air peut aussi bien être réalisée à travers le réservoir 1 comme présenté dans la section précédente.

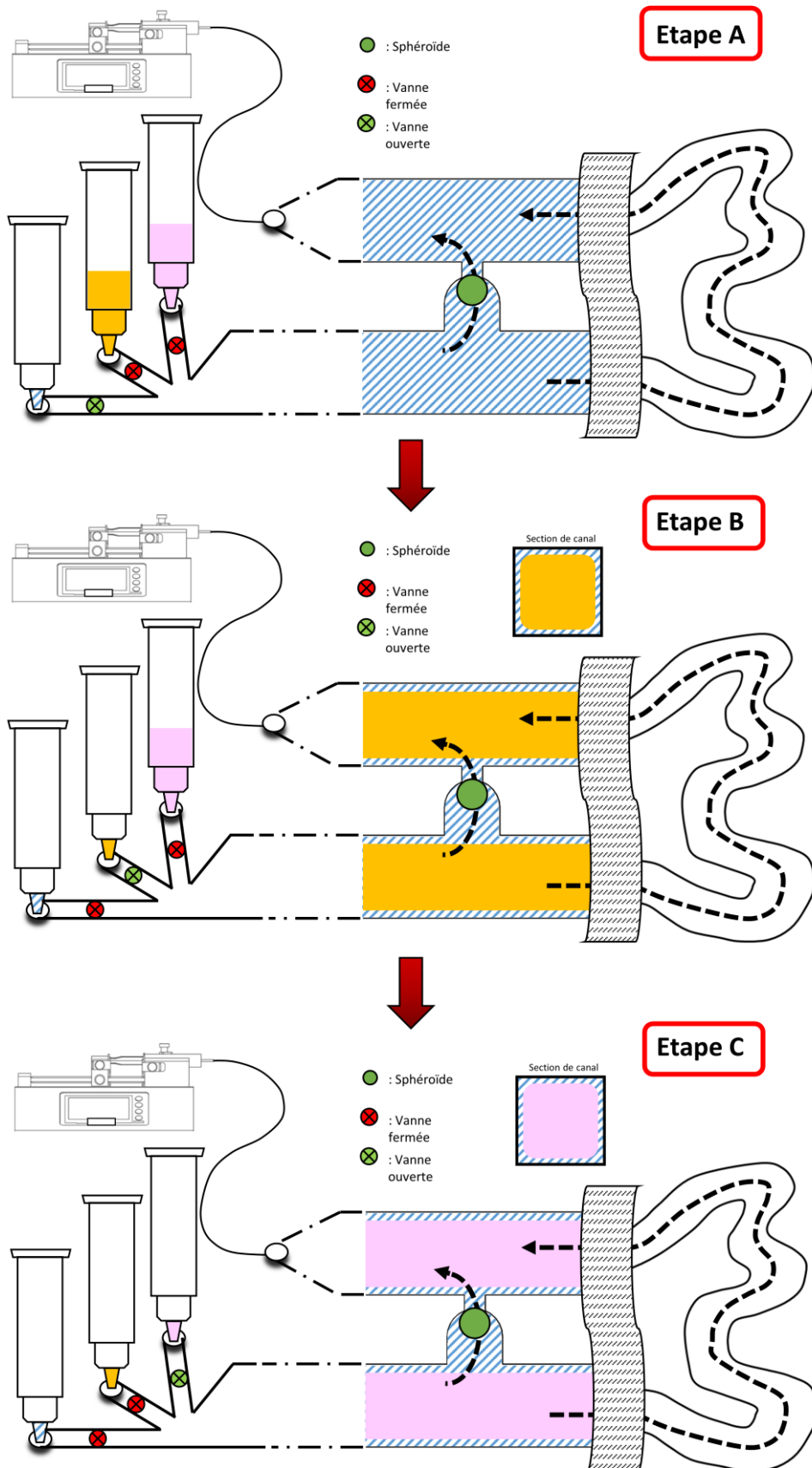


Figure 13 : Possible amélioration du dispositif proposé pour une automatisation complète du procédé d'injection, grâce à l'intégration de vannes.

Autre possibilité, les trois phases liquides peuvent être placées dans des puits réservoirs et être injectées en déplaçant un tube connecté à l'entrée fluide successivement dans les différents réservoirs puits (Fig. 14), ou classiquement déposées à l'entrée du circuit par un robot pipeteur.

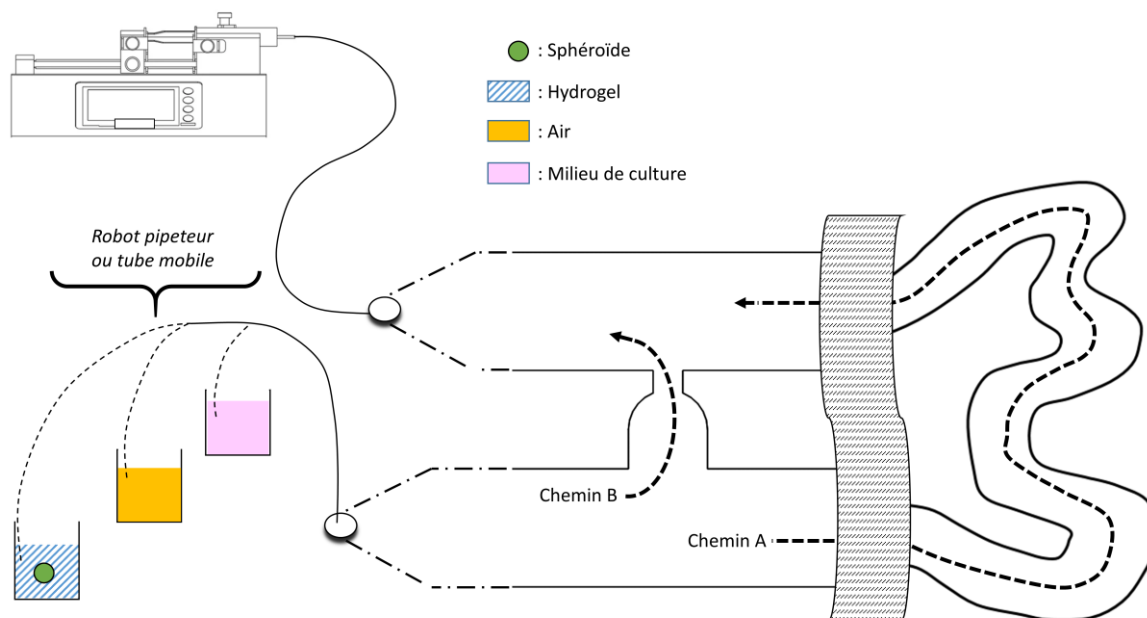


Figure 14 : Possible amélioration du dispositif proposé pour une automatisation complète du procédé d'injection, grâce à l'utilisation d'un robot pipeteur ou d'un tube mobile.

Notons aussi que le pousse-seringue peut être remplacé par un contrôleur en pression, ou par une pompe péristaltique. Enfin, l'architecture générale en serpentin peut être adaptée à la récolte des sécrétions cellulaires grâce à un réseau de vannes intégré au circuit microfluidique. Cette amélioration de l'architecture présentée ici fera l'objet du Chapitre 4.

Pour la clarté de l'exposé, le principe du modèle a été décrit au niveau d'une seule unité. Comme cela a déjà été évoqué, un des avantages du dispositif proposé est que cette unité peut être facilement mise en série en disposant les pièges les uns à la suite des autres dans un canal pouvant adopter différentes géométries. Il peut être en effet souhaitable, afin d'atteindre des rendements plus élevés, d'étudier plusieurs sphéroïdes biologiques au sein d'une même puce microfluidique.

Dans ce but, trois dispositifs sont proposés selon lesquels cette mise en série est effectuée. Ces trois architectures sont présentées en Fig. 15, la configuration en serpentin classique a, la configuration en serpentin couplée à un système de perfusion double b et la configuration en étoile c. Dans les configurations a et c, le principe reste le même : après piégeage du sphéroïde dans une restriction, le sphéroïde induit une forte perte de charge dans la cavité, ainsi le

sphéroïde suivant sera acheminé vers la cavité suivante et piégé par la restriction suivante et ainsi de suite. La configuration c présente un intérêt pratique dans un système de récolte des sécrétions cellulaires, dans lequel il serait nécessaire de laisser de l'espace autour de la cavité (non réalisée). Dans la configuration b, un système de dérivation est créé par l'intermédiaire de canaux microfluidiques plus étroits à proximité de chaque cavité. Cette solution permet de perfuser les sphéroïdes sur le long terme comme présenté précédemment à travers le canal microfluidique principal, puis de perfuser les sphéroïdes individuellement, sans recourir à un système de vannes, à travers le circuit de dérivation pour l'analyse des sécrétions des sphéroïdes. Cependant, un usinage classique de ce circuit est rendu impossible par les très faibles dimensions du circuit de dérivation. Ainsi une telle puce doit être réalisée à partir d'une technologie sur silicium, grâce à un procédé de gravure profonde (voir photo Fig. 15 b, réalisée mais non validée expérimentalement).

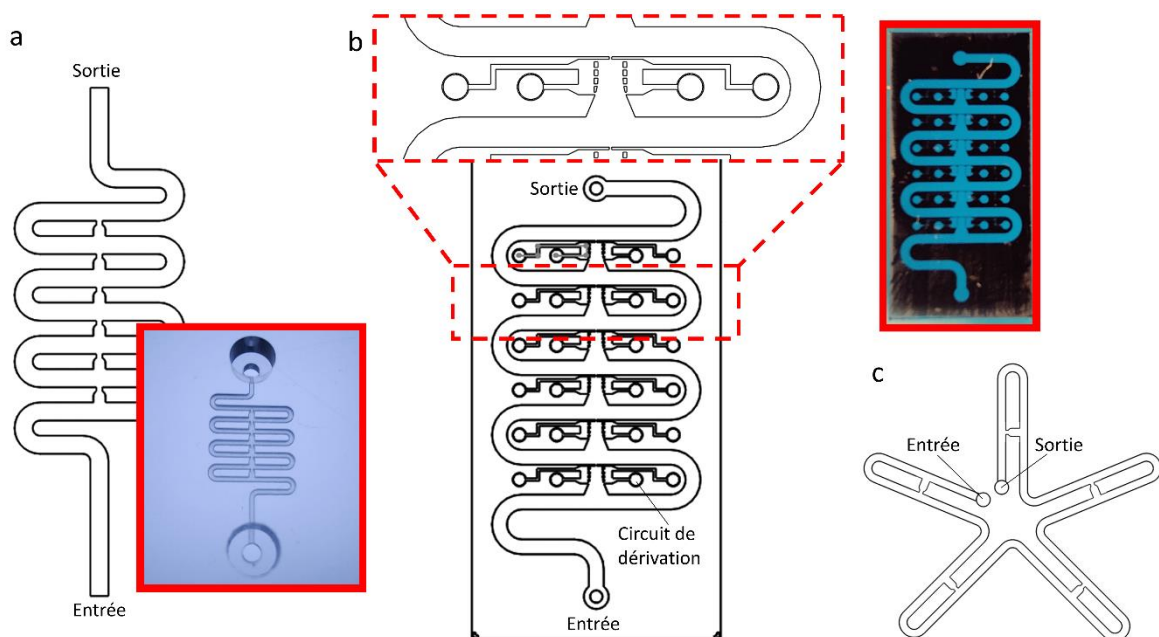


Figure 15 : Différentes géométries possible pour la mise en série de l'unité.

3.2 Vascularisation

A ce stade, seule a été décrite une méthode innovante d'encapsulation dans l'architecture en serpentin. Mais le dispositif microfluidique couplé au procédé d'injection présenté offre aussi la possibilité de vasculariser un sphéroïde ou un organoïde donné. L'idée générale est de créer un réseau endothélial, constitué par l'auto-assemblage des cellules, autour du sphéroïde ou de l'organoïde étudié. Avant la formation du réseau, l'écoulement se fait majoritairement par le chemin A laissé libre. L'écoulement selon le chemin B (obstrué par la présence de l'hydrogel dans la cavité) existe de par la différence de pression entre les points en amont et en aval de la cavité. Cet écoulement, très faible, est appelé flux interstitiel. Une fois le réseau endothélial formé et fonctionnel, l'écoulement peut également se faire à travers le chemin B par ce réseau, comme expliqué au chapitre précédent.

Dans une première configuration, le réseau endothélial est généré à partir d'un sphéroïde prolifératif modèle constitué de fibroblastes et de cellules endothéliales HUVEC. Dans la deuxième configuration, des cellules endothéliales sont suspendues dans le gel, lui-même porteur d'un sphéroïde ou d'un organoïde. Le sphéroïde / l'organoïde est ainsi vascularisé *via* des connexions avec le réseau endothélial environnant, formé par l'auto-assemblage par vasculogénèse des cellules préalablement suspendues dans le gel. Dans la dernière configuration possible (non testée expérimentalement), les cellules endothéliales s'assemblent en un réseau endothélial vers le sphéroïde selon un procédé d'angiogenèse que nous avons déjà décrit au chapitre précédent. Ces différentes configurations sont détaillées ci-dessous.

Monoculture à partir d'un sphéroïde seul :

Une première façon de générer un réseau endothélial dans la puce microfluidique choisie est de piéger un sphéroïde constitué de fibroblastes et de cellules endothéliales. Ce faisant, les cellules endothéliales ont la possibilité de s'auto-organiser en un réseau vasculaire au sein du microenvironnement (Fig. 16). Les fibroblastes vont également pouvoir proliférer, aidant à la stabilisation du réseau vasculaire.

Dans cette approche, c'est le sphéroïde lui-même qui se différencie en un réseau endothélial. Cette méthode peut ainsi permettre le développement et l'étude d'un réseau endothélial sur puce en tant que tel, mais ne peut *a priori* pas être envisagée pour la vascularisation d'autres tissus biologiques dont les cellules ne peuvent proliférer ou se différencier en réseau endothélial.

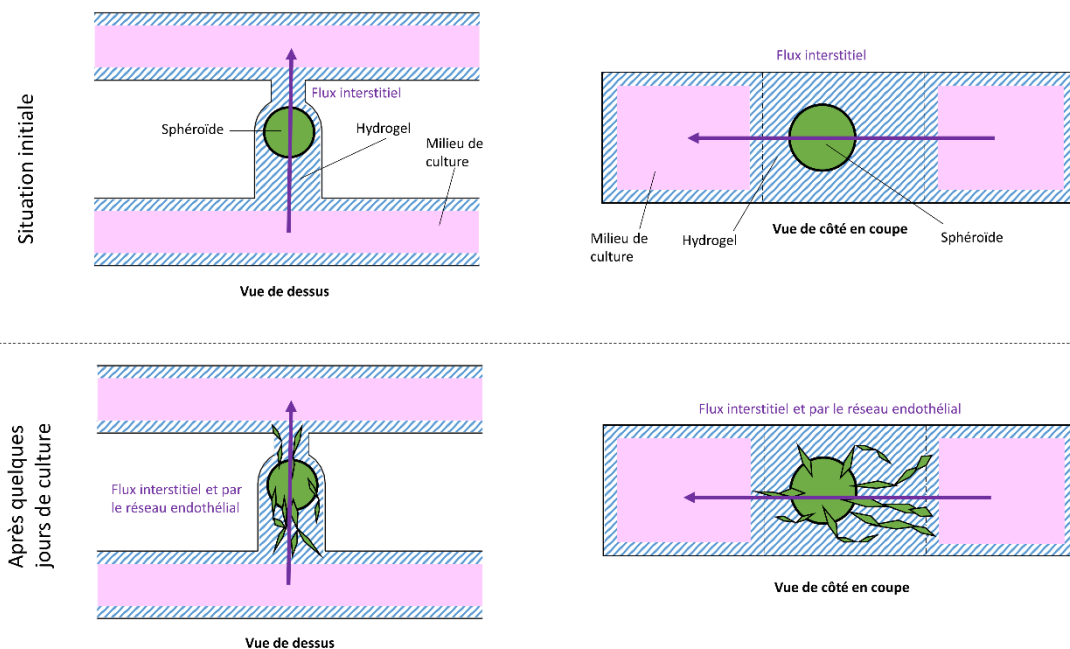


Figure 16 : Organisation du réseau endothélial par différenciation du sphéroïde et bourgeonnements des cellules endothéliales.

Co-culture à partir d'un sphéroïde ou un organoïde, et d'une suspension de cellules endothéliales dans le gel :

Pour surmonter cette limitation intrinsèque à la configuration précédente, on peut reprendre cette configuration en suspendant également des cellules endothéliales dans l'hydrogel (Fig. 17). Ces cellules vont alors pouvoir s'auto-organiser en un réseau endothélial autour du sphéroïde selon le processus de vasculogénèse décrit dans le chapitre précédent. Dans le cas où le sphéroïde d'étude n'est pas pré-vascularisé (par exemple : îlots de Langerhans natifs), le réseau peut se développer autour dudit sphéroïde voire l'enlacer, mais ne se connecte pas directement à lui. Dans le cas d'un sphéroïde pré-vascularisé (par exemple : sphéroïde modèle HUVEC/Fibroblastes (voir Chapitre 3 section 3.2), ou îlots de Langerhans pré-vascularisés (voir Chapitre 5 section 1.1), les vaisseaux du réseau endothélial peuvent alors se connecter à ceux du sphéroïde *via* un processus d'anastomose.

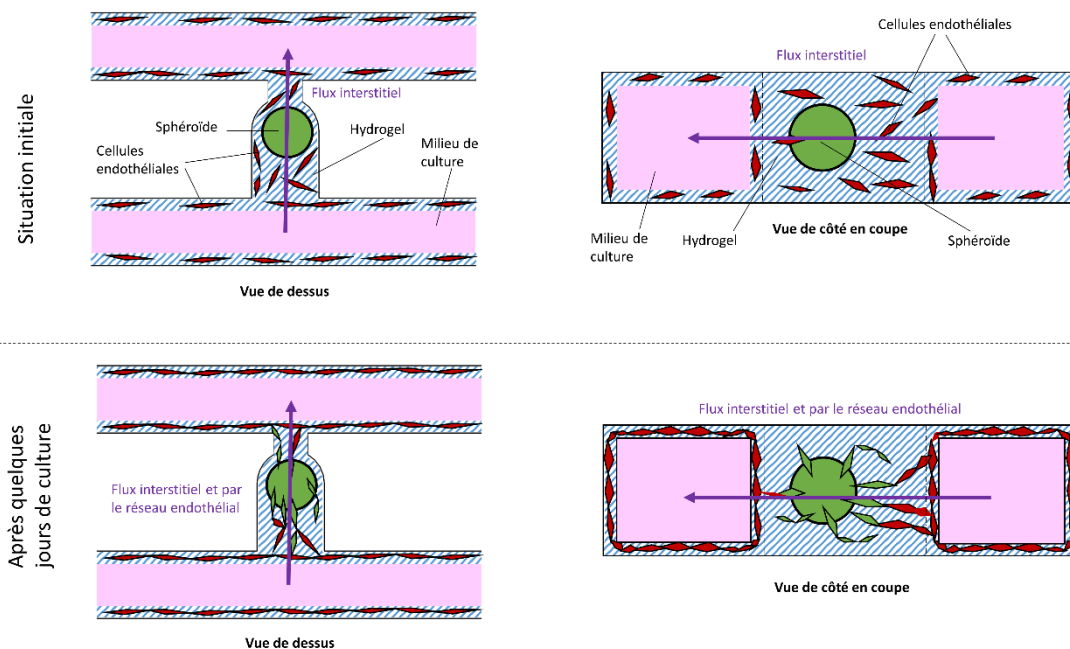


Figure 17 : Organisation du réseau endothélial par vasculogénèse se connectant à un sphéroïde prolifératif.

Plutôt que de travailler avec un sphéroïde prolifératif modèle, il peut être intéressant de vasculariser de la même manière un organoïde ou autre tissu biologique. L'approche décrite ci-dessus reste valable. Le réseau se développe grâce aux cellules endothéliales préalablement suspendues dans l'hydrogel, qui traverse la zone de piégeage de part en part. Selon la nature de l'organoïde, le réseau vasculaire peut se développer autour de l'organoïde. Une des problématiques qui nous occupera tout au long de cette thèse est également de savoir si un tel réseau est capable de se connecter à l'organoïde, si celui-ci est pré-vascularisé. C'est par

exemple l'objet des études que nous avons menées sur des sphéroïdes mésenchymateux, des organoïdes de vaisseaux sanguins et des organoïdes de cœur vascularisés (voir Chapitre 3). Notons que pour assurer une bonne stabilité du réseau endothélial, il est également nécessaire de suspendre des cellules support (fibroblastes) avec les cellules endothéliales dans l'hydrogel. Ces cellules support ne sont pas représentées sur les schémas afin de ne pas les surcharger.

Cette approche est donc particulièrement intéressante de par son caractère très général et sa ressemblance avec la physiologie humaine. En effet, grâce au résidu d'hydrogel sur les parois du canal, les cellules endothéliales vont rapidement tapisser le canal pour former en amont et en aval de la cavité, un substitut d'artère et de veine. Au niveau du canal traversant, apparaît une ramification en vaisseaux plus petits, mimant la conformation artérioles – capillaires – veinules du système vasculaire humain (Fig. 18). En définitive, l'ensemble du circuit microfluidique permet de mimer la vascularisation d'un tissu biologique avec pertinence.

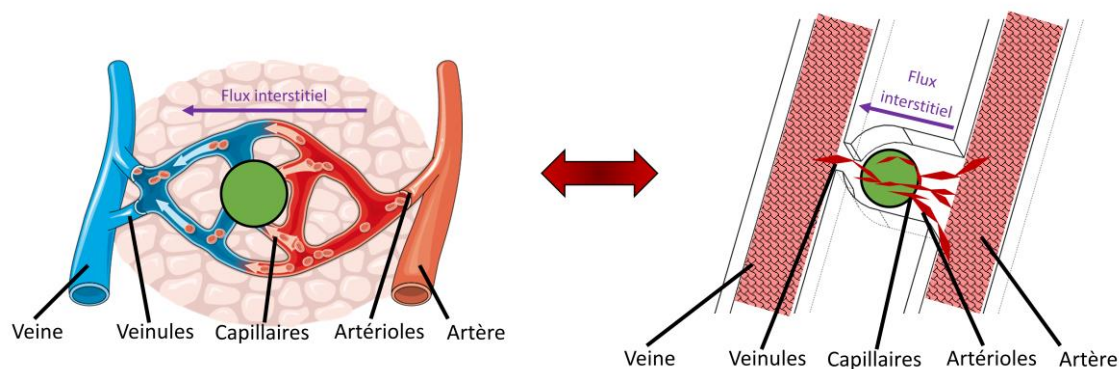


Figure 18 : Equivalence entre le système vasculaire humain et le canal microfluidique ainsi vascularisé.

Différents tissus biologiques peuvent ainsi être vascularisés afin d'être étudiés dans une configuration représentative du corps humain. Comme expliqué au Chapitre 1, bien que des progrès considérables aient été réalisés dans le domaine des organoïdes, ces derniers sont souvent étudiés dans des environnements très éloignés de la physiologie humaine¹⁵. Ici, ils peuvent être alimentés par un réseau vasculaire comme ils le sont dans la réalité. Cela est d'une importance cruciale dans de nombreux domaines. Par exemple, les métastases spécifiques à un organe, ou bien la circulation des cellules immunitaires, peuvent être étudiés en perfusant les cellules correspondantes à travers des réseaux endothéliaux fonctionnels^{16,17}. Par ailleurs, en hébergeant divers organoïdes vascularisés et interconnectés dans une puce où les cavités sont mises en série, il est possible d'étudier les interactions entre organes.

Par angiogenèse :

Enfin, une autre façon de faire consiste à suspendre les cellules dans le milieu de culture, puis à bloquer l'écoulement et attendre quelques minutes afin que les cellules sédimentent sur les parois du canal microfluidique (Fig. 19). Les cellules peuvent alors former un réseau vasculaire par angiogenèse en pénétrant dans le gel et perfuser l'organoïde d'étude. Cette configuration où le réseau endothélial se développe *via* le mécanisme d'angiogenèse s'oppose aux deux précédentes qui reposent sur le mécanisme de vasculogenèse. L'approche par angiogenèse est souvent utilisée pour comprendre les processus pathologiques à l'œuvre responsables de la croissance des tumeurs malignes ; il est donc particulièrement intéressant de travailler avec un tumoroïde dans ce cas.

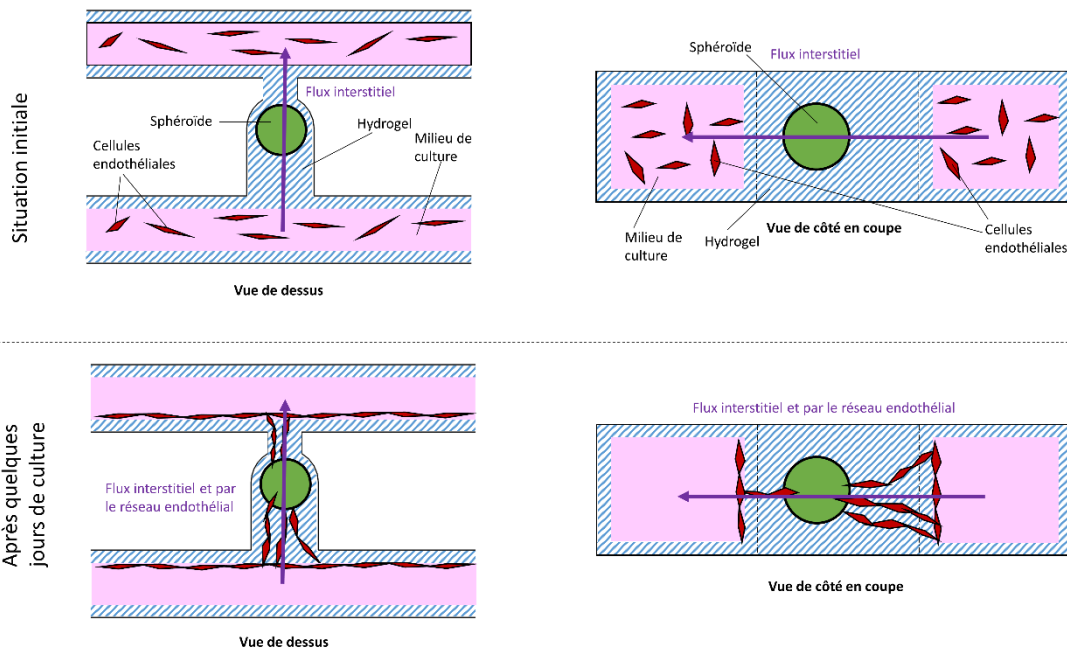


Figure 19 : Organisation du réseau endothélial par angiogenèse.

Notons que dans toutes ces configurations, le positionnement précis de l'hydrogel dans le canal microfluidique, ainsi que l'épaisseur du dépôt dans les coins et sur les parois lisses du canal, jouent un rôle déterminant dans le processus de vascularisation. Il est donc important d'étudier plus précisément ce phénomène ; c'est l'objet de la section qui suit.

4 Evaluation des paramètres de contrôle du dépôt du gel dans le canal microfluidique

4.1 Observation du dépôt de gel dans les coins et sur les parois du canal microfluidique

Expérimentalement, comme schématisé sur les figures de principe ci-dessus, on observe après le passage du doigt d'air, un résidu de gel sur les parois du canal microfluidique. Le gel reste également dans le piège environnant le sphéroïde, comme expliqué précédemment. En ajoutant un fluorochrome (Dextran FITC) à la composition du gel, celui-ci peut être observé à l'aide d'un microscope inversé à fluorescence (Fig. 20a). Cette méthode permet de facilement visualiser le résidu autour du sphéroïde dans le piège. Cependant, seule une représentation 2D (vue de dessus / dessous) nous est accessible. La répartition du gel dans une section transverse du canal n'est ainsi pas connue.

Pour surmonter cette difficulté, nous avons collaboré avec des opticiens du Laboratoire Systèmes d'Imagerie pour le Vivant (LSIV) ; Caroline Bissardon, Xavier Mermet et Pierre Blandin. Grâce à un microscope à nappe de lumière (plus communément appelé microscope « light sheet ») conçu au laboratoire (Fig. 20b), des vues transversales ainsi que les représentations tridimensionnelles sur une large portion de circuit microfluidique ont pu être obtenues (Fig. 20c). Enfin, à l'aide d'un microscope confocal, on peut également obtenir des vues transverses et tridimensionnelles du dépôt de gel grâce à la possibilité de prendre des images en se décalant très finement selon l'axe vertical (z-stack). Cette méthode a l'avantage d'être précise mais l'inconvénient de la lenteur : il faut en effet compter une dizaine de minute pour imager un coin de canal. Le microscope light sheet « fait maison » permet au contraire d'imager très rapidement une grande portion de canal microfluidique. Ce microscope, particulièrement adapté à l'imagerie de puces microfluidiques, a également été utilisé pour l'étude du développement des réseaux endothéliaux au jour le jour, qui seront présentés plus tard. Pour plus de détails, nous invitons le lecteur à se référer à notre article publié à ce sujet¹⁸.

En définitive, nous observons que le dépôt de gel dans le canal principal se fait majoritairement dans les coins. Si une fine couche de gel (d'épaisseur inférieure au micromètre) tapisse certainement les quatre parois rectilignes de la section carrée comme le suggère la littérature à ce sujet¹⁹, elle n'est pas observable avec nos méthodes. Le profil de gel résiduel dans le canal après passage de la bulle d'air est d'une importance particulière pour les objectifs de vascularisation que nous avons évoqués plus haut. En effet, le gel contient les cellules endothéliales qui vont revêtir l'ensemble du canal en serpentin de sorte à reproduire la structure artère – veine que nous avons décrite plus haut (section 3.2, Fig. 18). C'est pourquoi une étude quantitative a été consacrée à ce phénomène, c'est l'objet de la section suivante.

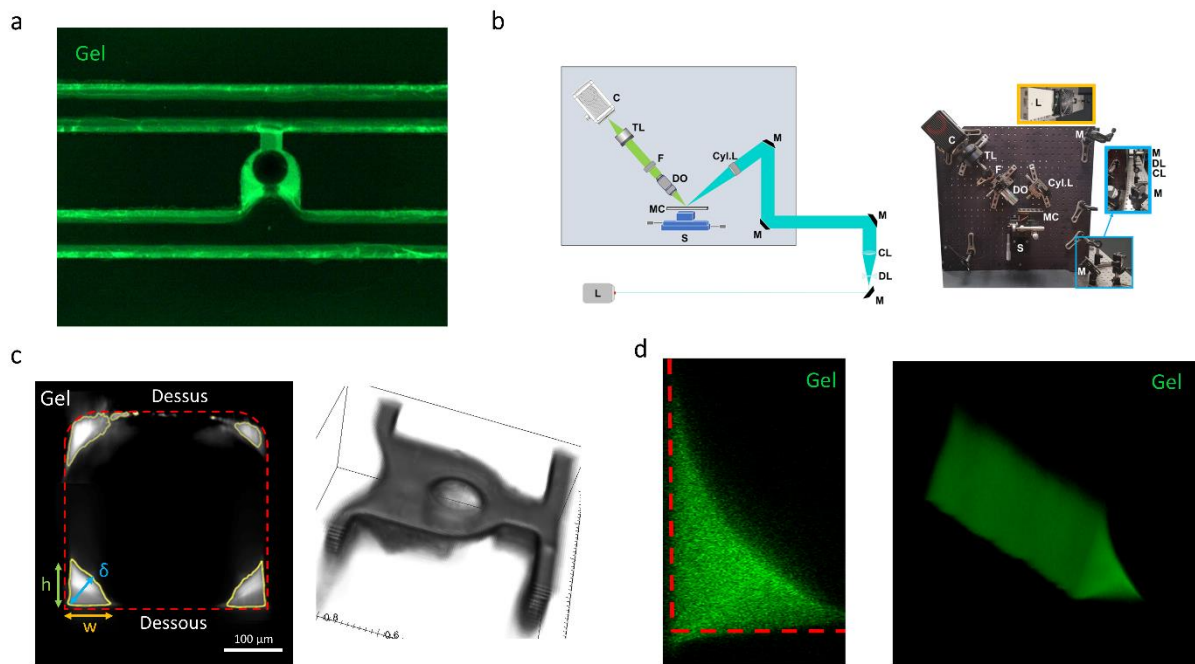


Figure 20 : Observation du dépôt de gel dans le canal microfluidique. **a.** Observation au microscope classique inversé donnant une représentation bidimensionnelle du dépôt. Ici, une bille en polystyrène est piégée (noir), et le gel est bien maintenu autour, **b.** Schéma de principe et dispositif expérimental du microscope à nappe de lumière (light sheet), **c.** Images d'une section transverse de canal dans sa partie rectiligne (gauche) et représentation tridimensionnelle de la zone de piégeage (droite) obtenues avec le microscope light sheet, **d.** Images du dépôt de gel dans un coin de canal obtenues avec le microscope confocal ; vue orthogonale (gauche) et tridimensionnelle (droite).

4.2 Présentation d'une approche fondamentale

Dans cette section, on se propose d'étudier le phénomène du dépôt de gel dans le canal microfluidique principal, nous avons choisi une approche fondamentale dans laquelle un modèle simplifié a été utilisé. En effet, la relative complexité des écoulements dans l'architecture en serpentin dans sa globalité rend délicate l'étude précise du phénomène de dépôt de gel dans les coins. Le modèle choisi est ainsi constitué d'un canal microfluidique droit, de section et de longueur identiques à celle du serpentin « déplié », ($400 \mu\text{m} \times 400 \mu\text{m}$, $L = 28,95 \text{ mm}$). Le dispositif expérimental reste le même, un pousse-seringue fonctionnement en mode aspiration est connecté à la sortie du canal et génère ainsi l'écoulement à débit fixé. La quantité de gel restant sur les parois du canal est fonction de la vitesse de la bulle d'air qui chasse le gel, donc du débit du pousse-seringue. Le but de cette étude est d'évaluer le profil de gel laissé sur les parois suivant une section transverse du canal, en fonction du débit de travail, afin d'établir quels débits sont les plus favorables à la mise en culture. Rappelons en effet que le gel est porteur d'une suspension de cellules endothéliales qui doivent permettre la vascularisation du sphéroïde ou de l'organoïde d'étude. Dans ces séries d'expériences, le gel ne contient pas de cellules mais un composé fluorescent (Dextran FITC) afin de faciliter son

observation. On négligera les changements de propriétés rhéologiques du gel associés. Rappelons également que lors de l'injection, le gel est à l'état liquide, ce n'est qu'après quelques minutes qu'il polymérise.

L'étude du revêtement d'un canal lors de l'éjection du liquide par injection d'air est un problème très contemporain, et intervient aujourd'hui dans de nombreuses applications allant de l'amélioration de la récupération du pétrole²⁰ à la conception de réacteurs monolithiques²¹, en passant par la fabrication de lentilles optiques²². L'injection d'air dans un canal rempli de liquide est un problème qui fait intervenir plusieurs paramètres variables tels que la forme des bulles d'air, celle de la section transverse du canal, ou encore le procédé d'injection, qui justifie la multitude d'articles à ce sujet. Les travaux de Landau et Levich²³ en 1942 puis ceux de Bretherton²⁴ en 1961 ont permis d'établir des lois reliant la vitesse de la bulle d'air à l'épaisseur de gel laissée sur les parois : $e \sim C_a^{2/3}$ où $C_a = \frac{U\eta}{\sigma}$ désigne le nombre capillaire avec U la vitesse de la bulle, η la viscosité du liquide et σ la tension superficielle entre le liquide et l'air (ici dans le cas d'un canal circulaire). Cette loi a ensuite été affinée et déclinée en fonction de la forme du canal, du mode d'injection, du régime de nombre capillaire, et divers autres paramètres^{25,26}. Notre configuration expérimentale n'ayant jamais été étudiée dans la littérature, il a été difficile d'aboutir à une nouvelle modélisation analytique dans le temps imparti.

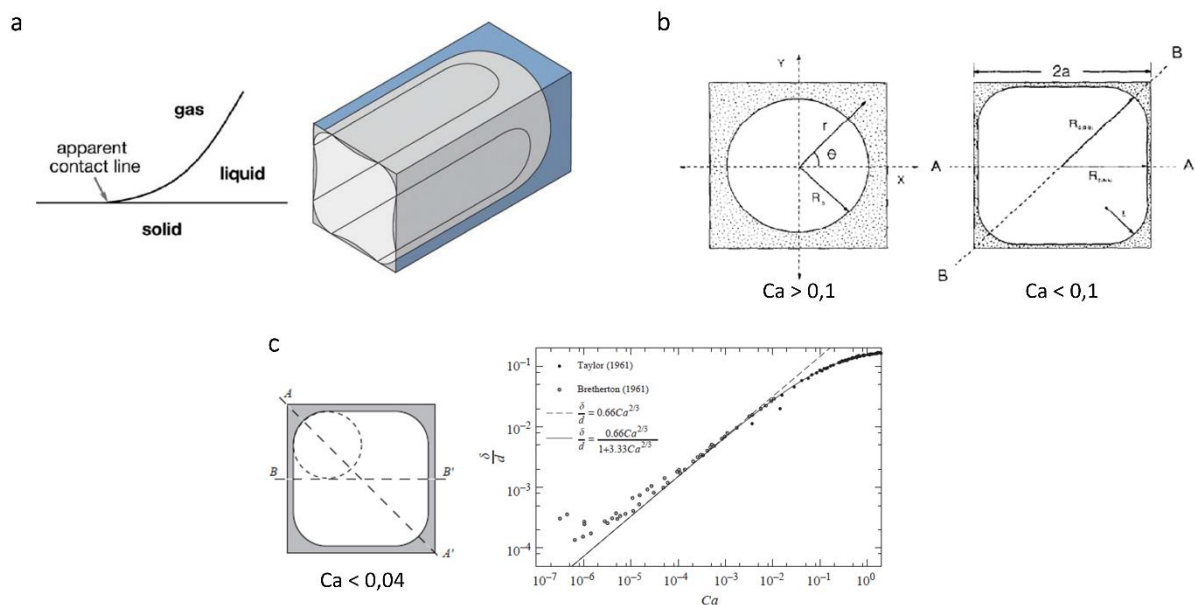


Figure 21 : Etude de l'épaisseur laissée par un liquide confiné dans un canal, chassé par une bulle d'air. **a.** Représentation schématique tridimensionnelle du passage d'une bulle d'air dans un canal rempli de liquide, adapté de Ajaev et al.¹⁹, **b.** Exemple de différence de profil de résidu de liquide dans une section transverse en fonction du nombre capillaire, adapté de Kolb et al.²⁷, **c.** Exemple de comparaison entre données expérimentales et modèles théoriques sur une large plage de nombre capillaire, adapté de Kreutzer et al.²⁸

Nous nous focaliserons ici sur le travail expérimental qui a été réalisé, en partie dans le cadre d'un travail de stage de Master effectué au laboratoire par Théo Champion. L'expérience se déroule de la façon suivante : on actionne le pousse-seringue à un débit donné puis on dépose 25 μl de gel à l'entrée du canal. Le gel remplit le canal, puis, une fois les 25 μl injectés, un doigt d'air pénètre dans le canal et chasse le gel vers la sortie (Fig. 22a et b). On attend quelques minutes la réticulation du gel et on mesure son épaisseur au microscope. Pour s'assurer d'une bonne précision dans les mesures, le choix s'est porté sur le microscope confocal. La viscosité du gel à l'état liquide a été préalablement mesurée au rhéomètre (pour ce faire, il suffit de ne pas ajouter la thrombine à la composition du gel afin qu'il ne réticule pas) ainsi que la tension superficielle, afin de connaître le nombre capillaire pour une vitesse d'injection donnée. Dans toute la gamme de débits testés, le dépôt de gel n'est visible que dans les coins du canal microfluidique. Si le dépôt est présent sur les faces lisses du canal à section carrée (comme le suggère la littérature scientifique), il est probablement d'épaisseur caractéristique inférieure au micromètre, ce qui rend son observation et son analyse délicate. Nous avons donc mesuré, en fonction du débit d'injection du doigt d'air, le dépôt de gel dans les coins – qui peut être grossièrement assimilé à un triangle rectangle –, selon deux dimensions, la « largeur » w et la « diagonale » δ (Fig. 22c). Les résultats préliminaires semblent indiquer que la largeur du dépôt croît quand le débit d'injection du doigt d'air augmente, pendant que la diagonale reste constante quel que soit le débit choisi. Il est difficile à ce stade de commenter ces résultats pour les comparer à ceux obtenus autrement dans la littérature scientifique, car de fortes incertitudes demeurent. D'abord, comme déjà évoqué, notre protocole d'injection est singulier et ne correspond à aucune étude déjà réalisée. Un travail supplémentaire serait nécessaire pour mesurer avec une caméra rapide la vitesse de pénétration de l'air dans le canal à chaque injection. Nous avons en effet remarqué que cette vitesse ne peut être simplement déduite du débit imposé avec le pousse-seringue et de la section du canal. Par ailleurs, la viscosité et les propriétés rhéologiques du gel changent rapidement après l'ajout de la thrombine. Ces raisons font qu'il est difficile de connaître précisément la gamme de nombre capillaire accessible avec notre dispositif expérimental.

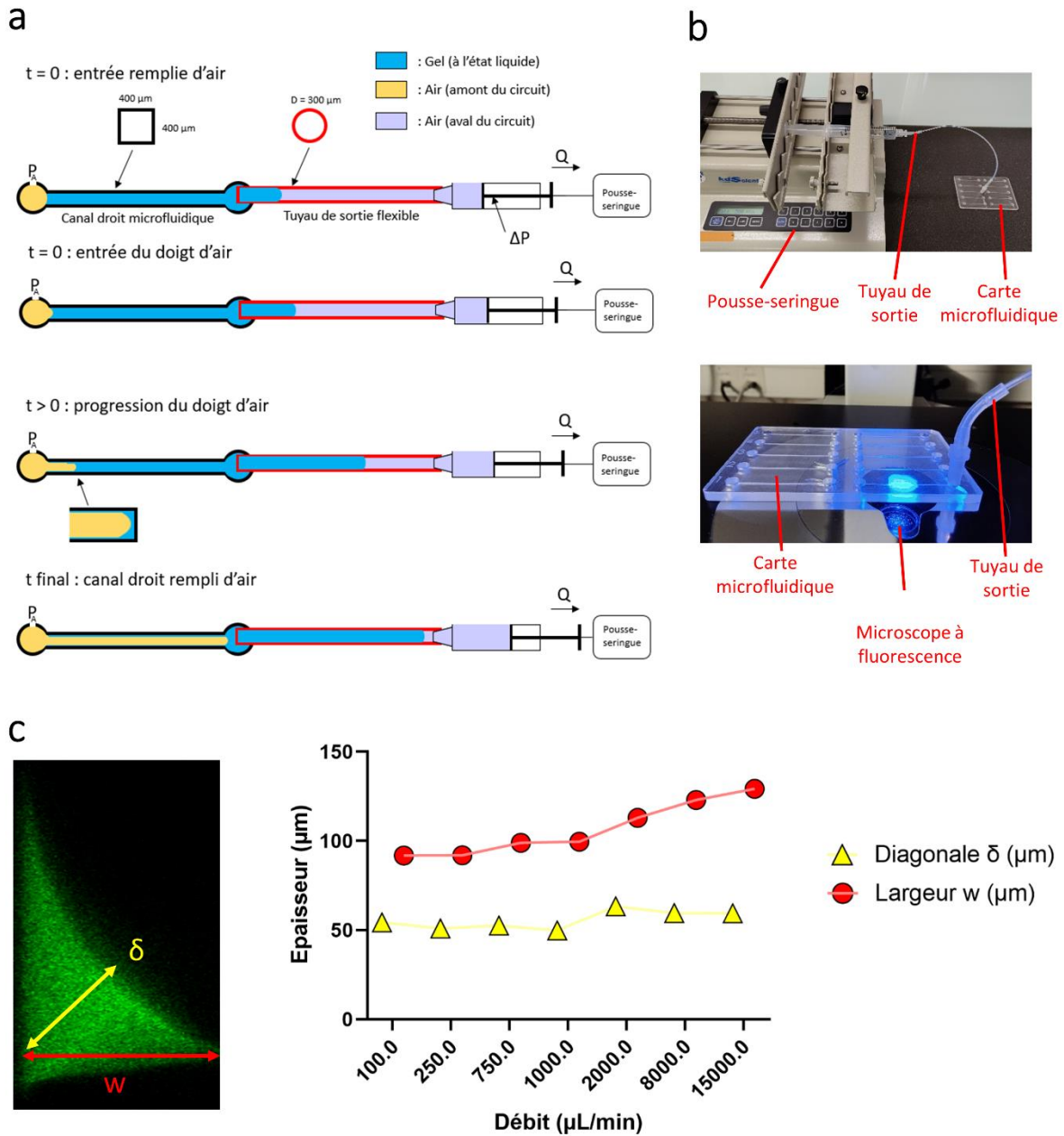


Figure 22 : Etude expérimentale de l'épaisseur de gel laissée dans un canal droit microfluidique, après passage d'un doigt d'air. **a.** Modèle expérimental du procédé d'injection, **b.** Photographie de la puce microfluidique contenant 10 canaux droits identiques et du dispositif expérimental, **c.** Mesures d'épaisseurs de gel déposé en fonction du débit. Chaque point sur le graphe représente la moyenne d'une mesure d'un triplicat (3 canaux droits indépendants).

Annexe A

Choix du matériau

Le PDMS (polydimethylsiloxane) est le matériau privilégié dans le domaine de la microfluidique. Grâce au procédé de « soft lithography » développé par l'équipe de G. Whitesides²⁹, ce matériau abondamment utilisé permet de fabriquer des puces microfluidiques en 24h de façon relativement simple. Cependant, le PDMS présente de nombreux inconvénients³⁰. D'abord, le procédé de fabrication des puces microfluidiques en PDMS, bien que confortable dans le milieu académique, n'est pas industrialisable. Pour des applications qui nécessitent une production à grande échelle, il est donc nécessaire de se tourner vers un autre choix. De plus, le PDMS adsorbe diverses molécules et peut relarguer dans le liquide environnant certaines molécules issues d'une mauvaise réticulation : ce point est particulièrement problématique pour les études d'analyse de sécrétions de sphéroïdes biologiques comme celles dont il sera question dans la suite de ce manuscrit. Enfin, le PDMS est un matériau qui vieillit et dont les propriétés mécaniques peuvent ainsi s'altérer au cours du temps³¹.

Le verre possède des propriétés intéressantes, notamment sa qualité optique, mais les procédés de fabrication sont complexes et coûteux.

Depuis plusieurs années, les puces microfluidiques en thermoplastiques sont de plus en plus utilisées par la communauté. Plusieurs techniques d'usinage et de moulage de ces matériaux permettent une fabrication à grande échelle. Différents thermoplastiques peuvent être employés tels que le PMMA (poly(méthacrylate de méthyle), plus couramment connu sous le nom de Plexiglas), le COP (cyclic olefin polymer) ou le COC (cyclic olefin copolymer)³². C'est vers ce dernier matériau que le choix du laboratoire s'est porté pour la fabrication des puces microfluidiques. Le COC, en comparaison au PDMS, est beaucoup moins sujet aux phénomènes d'adsorption, possède de meilleures qualités optiques (plus faible auto-fluorescence) et bénéficie d'une haute résistance aux solvants comme l'acétone, le méthanol ou l'isopropanol³³. Enfin, le COC est approuvé par la FDA et est largement employé pour la conception de dispositifs médicaux. C'est donc un matériau de choix pour les industriels de la microfluidique.

Conception et usinage des puces microfluidiques

Les puces sont dessinées à l'aide du logiciel de conception assistée par ordinateur (CAO) SolidWorks (Dassault Systems). Ce logiciel permet de concevoir les puces ainsi que des assemblages de puces en trois dimensions, avant de passer à l'étape de fabrication.

Dans le laboratoire, deux équipements de micro-usinage permettent de fabriquer les puces microfluidiques. Le premier est le Charly4U (Charly Robot), piloté par un logiciel (CharlyGraal) permettant de sélectionner pour chaque motif une profondeur et un type d'usinage. Cet équipement facile d'utilisation a permis de réaliser quelques composants lors de la première année de thèse, afin de valider certaines architectures fluidiques (systèmes de piégeages de sphéroïdes en particulier). Bien que très utile pour des réalisations simples, cet équipement ne

prend pas en compte les défauts de planéité des plaques de COC et de plus la précision selon l'axe z n'est pas bonne.

Un deuxième équipement, plus robuste, est ainsi disponible au laboratoire. Il s'agit d'une machine de micro-fraisage (Datron M7HP) qui permet la réalisation de motifs plus complexes avec une grande précision. Par ailleurs, en comparaison du Charly4U, la Datron M7HP est plus rapide et effectue le changement des outils automatiquement ; elle est ainsi plus adaptée à la production d'un plus grand nombre de puces de façon automatisée. Le temps d'usinage moyen dépend de la complexité de l'architecture et du nombre de perçages. Pour les puces microfluidiques qui sont présentées dans ce document, le temps d'usinage est classiquement d'environ 1 heure.

Annexe B

```
X = 0:50:10000; % x = L_A
Y = 0:10:400; % y = w_B

h = 400;
wI = 500;
L_B = 100;

[x,y] = meshgrid(X,Y);

G = y/wI;
K = 9.70+18.*(y/h).^1.1;
alpha_B = y/h;
Pob = 24.*(1 - 1.3553.*alpha_B + 1.9467.*alpha_B.^2 - 1.7012.*alpha_B.^3 +
0.9564.*alpha_B.^4 - 0.2537.*alpha_B.^5);

Z = 0.035.*(h./x).*(h./y).^3.*((1/2)*(L_B/h).*((y/h)+1).^2.*Pob.*(y/h)+(1-
G).*K.*(y/h)); % Z = Q_A/Q_B

surf(x/h,y/h,Z)

%%%%%%%%% VALUE CHECK %%%%%%%%%%

% Spheroids
x = 7420;
y = 200;
h = 400;
wI = 500;
L_B = 100;
G = y/wI;
K = 9.70+18*(y/h)^1.1;
alpha_B = y/h;
Pob = 24*(1 - 1.3553*alpha_B + 1.9467*alpha_B^2 - 1.7012*alpha_B^3 +
0.9564*alpha_B.^4 - 0.2537*alpha_B^5);
Z_S = 0.035*(h/x)*(h./y)^3*((1/2)*(L_B/h)*((y/h)+1)^2*Pob*(y/h)+(1-G)*K*(y/h)) % Z
= Q_A/Q_B

% Organoids
x = 13740;
y = 300;
h = 800;
wI = 900;
L_B = 100;
G = y/wI;
K = 9.70+18*(y/h)^1.1;
alpha_B = y/h;
Pob = 24*(1 - 1.3553*alpha_B + 1.9467*alpha_B^2 - 1.7012*alpha_B^3 +
0.9564*alpha_B.^4 - 0.2537*alpha_B^5);
Z_O = 0.035*(h/x)*(h./y)^3*((1/2)*(L_B/h)*((y/h)+1)^2*Pob*(y/h)+(1-G)*K*(y/h)) % Z
= Q_A/Q_B
```

Bibliographie

1. Nashimoto, Y. *et al.* Vascularized cancer on a chip: The effect of perfusion on growth and drug delivery of tumor spheroid. *Biomaterials* **229**, 119547 (2020).
2. Rambøl, M. H., Han, E. & Niklason, L. E. Microvessel Network Formation and Interactions with Pancreatic Islets in Three-Dimensional Chip Cultures. *Tissue Eng. Part A* (2019) doi:10.1089/ten.tea.2019.0186.
3. Shin, N. *et al.* Vascularization of iNSC spheroid in a 3D spheroid-on-a-chip platform enhances neural maturation. *Biotechnol. Bioeng.* **n/a**,
4. Silva, P. N., Green, B. J., Altamentova, S. M. & Rocheleau, J. V. A microfluidic device designed to induce media flow throughout pancreatic islets while limiting shear-induced damage. *Lab. Chip* **13**, 4374–4384 (2013).
5. Ruppen, J. *et al.* A microfluidic platform for chemoresistive testing of multicellular pleural cancer spheroids. *Lab. Chip* **14**, 1198–1205 (2014).
6. Nourmohammadzadeh, M. *et al.* Microfluidic Array with Integrated Oxygenation Control for Real-Time Live-Cell Imaging: Effect of Hypoxia on Physiology of Microencapsulated Pancreatic Islets. *Anal. Chem.* **85**, 11240–11249 (2013).
7. Tan, W.-H. & Takeuchi, S. A trap-and-release integrated microfluidic system for dynamic microarray applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**, 1146–1151 (2007).
8. Zhang, M. *et al.* Highly parallel and efficient single cell mRNA sequencing with paired picoliter chambers. *Nat. Commun.* **11**, 1–13 (2020).
9. Zbinden, A. *et al.* Non-invasive marker-independent high content analysis of a microphysiological human pancreas-on-a-chip model. *Matrix Biol.* **85–86**, 205–220 (2020).
10. Xing, Y. *et al.* A pumpless microfluidic device driven by surface tension for pancreatic islet analysis. *Biomed. Microdevices* **18**, 80 (2016).
11. Anduze, M. Etude expérimentale et numérique de microécoulements liquides dans les microsystèmes fluidiques. (L'Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse, 2000).
12. Shah, R. K. & London, A. L. Laminar Flow Forced Convection in Ducts. (1978).
13. Zivkovic, V., Zerna, P., Alwahabi, Z. T. & Biggs, M. J. A pressure drop correlation for low Reynolds number Newtonian flows through a rectangular orifice in a similarly shaped micro-channel. *Chem. Eng. Res. Des.* (2013) doi:10.1016/j.cherd.2012.05.022.
14. Quintard, C., Achard, J.-L. & Fouillet, Y. Method for achieving microfluidic perfusion of a spheroid and device suitable for implementing said method. (2021).
15. Garreta, E. *et al.* Rethinking organoid technology through bioengineering. *Nat. Mater.* 1–11 (2020) doi:10.1038/s41563-020-00804-4.
16. Chen, M. B. *et al.* On-chip human microvasculature assay for visualization and quantification of tumor cell extravasation dynamics. *Nat. Protoc.* **12**, 865–880 (2017).
17. Gilardi, M. *et al.* The driving role of the Cdk5/Tln1/FAKs732 axis in cancer cell extravasation dissected by human vascularized microfluidic models. *Biomaterials* **276**, 120975 (2021).
18. Bissardon, C. *et al.* Vascular organ-on-chip imaging: a dedicated single plane illumination fluorescence microscope. <https://www.spiedigitallibrary.org/conference-proceedings-of-spie/11921/2615633/Vascular-organ-on-chip-imaging--a-dedicated-single-plane/10.1117/12.2615633.short?SSO=1>.
19. Ajaev, V. S. & Homsy, G. M. Modeling shapes and dynamics of confined bubbles. *Annu Rev Fluid Mech* **38**, 277–307 (2006).
20. Huerre, A., Miralles, V. & Jullien, M.-C. Bubbles and foams in microfluidics. *Soft Matter* **10**, 6888–6902 (2014).
21. Durán Martínez, F.-L. Réacteur-échangeur de type monolithe - stratégie de modélisation et description des phénomènes à l'échelle d'un canal catalytique unique. (2017).
22. Hartmann, D. M., Kibar, O. & Esener, S. C. Optimization and theoretical modeling of polymer microlens arrays fabricated with the hydrophobic effect. *Appl. Opt.* **40**, 2736–2746 (2001).
23. Landau, L. & Levich, B. Dragging of a Liquid by a Moving Plate. 141–153 (1988) doi:10.1016/B978-0-08-092523-3.50016-2.
24. Bretherton, F. P. The motion of long bubbles in tubes. *J. Fluid Mech.* **10**, 166–188 (1961).
25. Kolb, W. B. & Cerro, R. L. The motion of long bubbles in tubes of square cross section*. *Phys. Fluids Fluid Dyn.* **5**, 1549–1557 (1993).
26. Wong, H., Radke, C. J. & Morris, S. The motion of long bubbles in polygonal capillaries. Part 1. Thin films. *J. Fluid Mech.* **292**, 71–94 (1995).
27. Kolb, W. B. & Cerro, R. L. Coating the inside of a capillary of square cross section. *Chem. Eng. Sci.* **46**, 2181–2195 (1991).
28. Kreutzer, M. T., Kapteijn, F., Moulijn, J. A. & Heiszwolf, J. J. Multiphase monolith reactors: Chemical reaction engineering of segmented flow in microchannels. *Chem. Eng. Sci.* **60**, 5895–5916 (2005).
29. Xia, Y. & Whitesides, G. M. Soft Lithography. *Annu. Rev. Mater. Sci.* **28**, 153–184 (1998).
30. Gokaltun, A., Yarmush, M. L., Asatekin, A. & Usta, O. B. Recent advances in nonbiofouling PDMS surface modification strategies applicable to microfluidic technology. *TECHNOLOGY* **05**, 1–12 (2017).
31. Schneider, F., Fellner, T., Wilde, J. & Wallrabe, U. Mechanical properties of silicones for MEMS. *J. Micromechanics Microengineering* **18**, 065008 (2008).

32. Nunes, P. S., Ohlsson, P. D., Ordeig, O. & Kutter, J. P. Cyclic olefin polymers: emerging materials for lab-on-a-chip applications. *Microfluid. Nanofluidics* **9**, 145–161 (2010).
33. van Midwoud, P. M., Janse, A., Merema, M. T., Grootuis, G. M. M. & Verpoorte, E. Comparison of Biocompatibility and Adsorption Properties of Different Plastics for Advanced Microfluidic Cell and Tissue Culture Models. *Anal. Chem.* **84**, 3938–3944 (2012).

Chapitre 3 :

Plateforme microfluidique automatisée pour la vascularisation d'organoïdes-sur-puce

Chapitre 3

Chapitre 3 :	91
Plateforme microfluidique automatisée pour la vascularisation d'organoïdes-sur-puce	91
1 Introduction.....	93
1.1 Idée directrice.....	93
1.2 Contexte de l'étude	93
2 Matériel et méthodes.....	94
2.1 Piégeage de l'organoïde et ensemencement de la puce microfluidique	95
2.2 Culture cellulaire et génération des sphéroïdes et des organoïdes.....	95
2.3 Préparation de l'hydrogel.....	96
2.4 Fabrication du dispositif	97
2.5 Imagerie cellulaire	97
2.6 Microscope à fluorescence à feuille de lumière.....	98
2.7 Immunomarquage sur puce	99
2.8 Analyse des réseaux endothéliaux	99
2.9 Analyse statistique	99
3 Résultats	100
3.1 Conception d'un dispositif microfluidique pour le piégeage précis d'organoïdes et de leur micro-environnement	100
3.2 Formation de réseaux endothéliaux interconnectés	102
3.3 Fonctionnalité du réseau endothélial	105
3.4 Organoïdes de vaisseaux sanguins	108
3.5 Anastomose entre réseaux endothéliaux et organoïdes	110
3.6 Organoïdes de cœur.....	115
4 Conclusion	117
Annexe A	119
Bibliographie.....	121

Ce chapitre est largement adapté de l'article « An automated microfluidic platform integrating functional vascularized organoids-on-chip », Quintard et al.¹, disponible en Annexe 1 en fin de manuscrit.

1 Introduction

1.1 Idée directrice

Dans le chapitre précédent, nous avons détaillé la conception d'une architecture microfluidique en serpentin, permettant de placer à un endroit précis à la fois un sphéroïde/organoïde et son micro-environnement en vue d'une vascularisation. Ce chapitre propose une validation expérimentale de cette méthode de mise en culture en utilisant différents modèles biologiques. D'abord un modèle de sphéroïde mésenchymateux constitué de cellules endothéliales (HUVEC) et de cellules support (fibroblastes). Ce modèle peut être vu comme une démonstration de la faisabilité de vasculariser différents tissus biologiques pré-vascularisés avec notre approche. Nous verrons ensuite que cette méthode s'est montrée fructueuse pour la vascularisation d'organoïdes de vaisseaux sanguins générés à partir de cellules souches humaines pluripotentes induites (hiPSC pour human induced pluripotent stem cells en anglais). Enfin, nous évoquerons rapidement des travaux préliminaires menés sur des organoïdes de cœur (ou cardioïdes) pré-vascularisés, également générés à partir de hiPSC.

Comme évoqué au Chapitre 1, travailler avec de tels organoïdes plutôt qu'avec des sphéroïdes est particulièrement important pour construire des modèles plus pertinents sur le plan physiologique. En effet, grâce aux récents efforts de la communauté pour développer des organoïdes à partir de cellules souches humaines intégrant de plus en plus de complexité biologique, les résultats obtenus sur ces modèles sont de plus en plus extrapolables à l'homme. Hans Clevers, chercheur à l'Université de Utrecht, a en ce sens récemment déclaré : « *Dans 20 ans, je pense que les organoïdes auront remplacé l'expérimentation animale dans les tests toxicologiques. Il y aura beaucoup plus d'applications pour utiliser les organoïdes afin de prédire les réponses humaines, que ce soit aux médicaments ou aux infections* »². La microfluidique est parfaitement adaptée pour permettre un plus grand contrôle et suivi de ces objets biologiques, et d'y incorporer les aspects dynamiques pour en faire de meilleurs modèles encore. Ainsi Matthias Lutolf, professeur à l'École Polytechnique Fédérale de Lausanne (EPFL), confiait en septembre 2021 dans un entretien : « *Je ne vois rien de plus intéressant et de plus passionnant que de développer des modèles fonctionnels de tissus ou d'organes humains et de maladies, et de les utiliser pour mieux comprendre la biologie humaine et, en fin de compte, aider les patients humains. [...] Cela pourrait changer la donne non seulement pour la biologie fondamentale, mais aussi pour le développement de médicaments et la médecine, car il existe un certain nombre de domaines d'application où il n'existe pratiquement aucun système modèle et où seuls des essais cliniques permettent de savoir si une nouvelle approche thérapeutique fonctionne ou non. Mais bien sûr, les organoïdes ne sont pas encore parfaits. [...] C'est là qu'interviennent les approches d'ingénierie, telles que la technologie des organes-sur-puce et la microfluidique, qui, selon moi, complètent parfaitement les organoïdes* »³.

1.2 Contexte de l'étude

La capacité de vasculariser des organoïdes reste un défi dans le domaine de l'ingénierie tissulaire. En effet, la plupart des tissus dépassant 400 μm d'épaisseur ont besoin d'un système vasculaire fonctionnel pour assurer un apport suffisant en nutriments et en oxygène, ainsi que pour éliminer le dioxyde de carbone et autres déchets cellulaires, afin de se prémunir de la formation d'un cœur nécrotique au sein du tissu⁴. Bien que plusieurs approches aient été utilisées pour créer des réseaux endothéliaux sur puce, la méthode basée sur l'auto-organisation des cellules endothéliales est celle qui est généralement privilégiée, car elle reproduit convenablement les processus de vasculogenèse et d'angiogenèse *in vivo*⁵. L'auto-organisation peut être obtenue en ensemençant des cellules endothéliales et des cellules support (typiquement des fibroblastes) dans un hydrogel, qui mime la matrice extracellulaire et fournit ainsi une matrice structurale dans laquelle les cellules peuvent se développer dans les trois dimensions de l'espace⁶. De nombreux progrès ont été réalisés pour générer des réseaux endothéliaux perfusables sur puce, soit en tant que tissu à part entière⁷⁻⁹, soit en incorporant des sphéroïdes tels que des micro-

tumeurs ou des îlots pancréatiques¹⁰⁻¹⁴. Par rapport aux sphéroïdes, les organoïdes présentent l'avantage de reproduire la structure et la fonction complexes d'un organe en 3D. Cependant, ils sont généralement cultivés dans des conditions statiques et en l'absence de vascularisation. Récemment, des efforts importants ont été consacrés au développement d'organoïdes vascularisés^{15,16}. Cependant, à notre connaissance, aucun système *in vitro* n'a montré une perfusion intravasculaire, c'est-à-dire au sein d'un organoïde, *via* des anastomoses fonctionnelles entre ledit organoïde et un réseau endothélial environnant.

Comme nous l'avons vu au Chapitre 1, les conceptions actuelles des puces microfluidiques consistent principalement en une microchambre centrale, délimitée par deux microcanaux latéraux de perfusion. Le gel contenant les cellules est pipeté dans la microchambre centrale, et des murets ou des piliers doivent être micro-usinés dans les puces pour éviter les fuites de l'hydrogel dans les canaux de perfusion¹⁷⁻¹⁹. De manière générale, la manipulation des liquides est délicate dans ce type d'architecture microfluidique. Par exemple, des astuces techniques, comme le fait de poser la puce microfluidique dans un bain de glace lors du remplissage, sont souvent nécessaires pour ralentir la cinétique de polymérisation des hydrogel²⁰⁻²². La plupart des dispositifs microfluidiques ne prévoient pas non plus de mécanisme de piégeage automatique de l'objet biologique d'intérêt. Par exemple, Nashimoto et al.²¹ doivent déposer manuellement un sphéroïde modèle dans un puits spécifique prévu à cet effet, micro-usiné dans une puce. Phan et al.²³ ont incorporé des micro-organes et des micro-tumeurs dans leur plateforme microfluidique, mais sans la possibilité de contrôler précisément leur emplacement.

Les technologies d'organes-sur-puce sont apparues au cours de la dernière décennie et sont très prometteuses. Elles constituent des outils puissants pour étudier les mécanismes biologiques fondamentaux, améliorer les tests de toxicité et cribler de nouveaux médicaments²⁴. Cependant, il est devenu évident que des efforts importants sont nécessaires pour fournir des moyens robustes et accessibles afin de développer des organes- et organoïdes-sur-puce vascularisés^{25,26}. Dans ce chapitre, nous présentons un dispositif innovant basé sur l'architecture en serpentif largement décrite dans le chapitre précédent, qui permet une localisation automatisée et précise des sphéroïdes ou des organoïdes. Ce système a été validé en utilisant des sphéroïdes générés à partir de fibroblastes et de cellules endothéliales ainsi que des organoïdes de vaisseaux sanguins générés à partir de cellules souches humaines pluripotentes induites (iPSC)²⁷. Ces organoïdes ont été générés par l'Institute of Molecular Biotechnology (IMBA) à Vienne en Autriche, dans le cadre d'une collaboration avec le Penninger Lab. Dans cette étude, nous avons démontré l'anastomose entre le réseau endothélial environnant et l'organoïde de vaisseaux sanguins, ainsi que la perfusion intravasculaire des organoïdes. Nous fournissons ainsi une méthode de vascularisation d'organes-sur-puce qui peut être adaptée à une multitude d'autres agrégats cellulaires 3D, tels que des organoïdes, des tumoroides, des sphéroïdes ou d'autres tissus biologiques.

Les résultats présentés dans ce Chapitre sont donc le fruit d'une collaboration entre différents laboratoires et projets. Les projets menés au CEA dans les thématiques « organoïdes » et « organes-sur-puce » ont permis des rapprochements entre le laboratoire Biomix de la Direction de la Recherche Fondamentale (DRF) et le laboratoire LSMB de la Direction de la Recherche Technologique (DRT), mais aussi des collaborations avec des opticiens et des laboratoires extérieurs spécialisés dans la production d'organoïdes. Nous reviendrons plus précisément sur ces différentes formes de collaboration au cours de ce chapitre.

2 Matériel et méthodes

2.1 Piégeage de l'organoïde et ensemencement de la puce microfluidique

Une seringue a été utilisée comme réservoir à l'entrée du canal microfluidique pour injecter, selon la méthode décrite au chapitre précédent, trois phases fluides dans l'ordre suivant: l'hydrogel (1) dans lequel les sphéroïdes/organoïdes, les cellules endothéliales et les fibroblastes étaient incorporés, l'air (2), et le milieu de culture (3). Le canal microfluidique en serpentin utilisé ici a déjà été décrit dans le chapitre précédent. L'injection des différents fluides a été effectuée à l'aide d'un pousse seringue connecté à la sortie du canal et utilisé dans son mode de fonctionnement en aspiration, à un débit de $Q = 300 \mu\text{l}/\text{min}$. Un sphéroïde/organoïde a été prélevé dans une plaque 96 puits à l'aide d'une pipette, puis déposé dans un Eppendorf contenant $50 \mu\text{l}$ d'hydrogel dans lequel cellules endothéliales HUVEC (6×10^6 cellules/ml) et fibroblastes (2×10^6 cellules/ml) ont été préalablement suspendues. Ces $50 \mu\text{l}$ d'hydrogel ont alors été déposés dans le réservoir à l'entrée du dispositif et injectés dans le canal, où le sphéroïde/organoïde a été piégé dans le bipasse. L'air a été injecté de la même manière immédiatement après l'étape d'injection de l'hydrogel. L'hydrogel a ainsi été poussé vers la sortie du canal (voir Chapitre 2 pour plus de détails). Après la polymérisation du gel à température ambiante pendant 15 minutes, le milieu de culture a été perfusé à un débit de $Q = 1 \mu\text{l}/\text{min}$ pendant la durée de l'expérience. Enfin, le dispositif a été placé dans un incubateur à 37°C et 5% de CO_2 (Fig. 1).

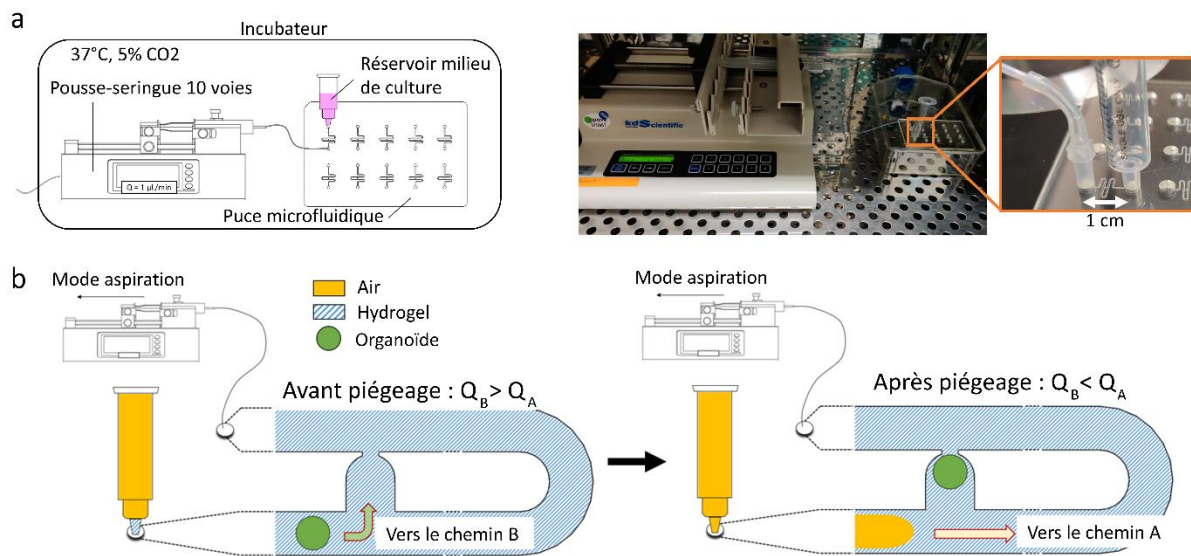


Figure 1 : Montage expérimental pour la perfusion continue d'organoïdes-sur-puce. **a.** Schéma et photo de la plateforme microfluidique. En utilisant un pousse-seringue 10 voies, le débit peut être contrôlé dans 10 circuits indépendants, usinés au sein d'une même puce microfluidique. Pour une meilleure visualisation, seul un microcanal a été connecté au pousse-seringue sur cette photo, **b.** Schéma montrant le piégeage et l'encapsulation d'un organoïde avec les débits associés le long des chemins A et B (Q_A et Q_B , respectivement).

2.2 Culture cellulaire et génération des sphéroïdes et des organoïdes

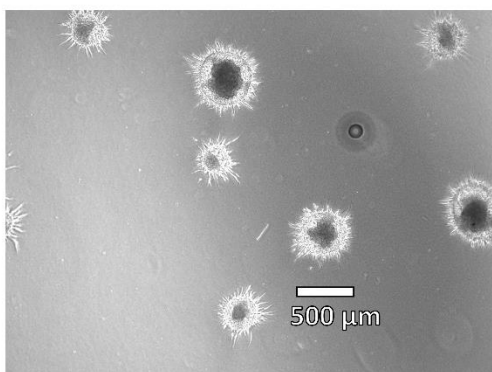
Des fibroblastes humains primaires ont été extraits d'explants de peau obtenus lors de la chirurgie mammaire d'une jeune femme en bonne santé après consentement éclairé ; ce tissu a été fourni par Walid Rachidi, CEA, Grenoble. Les cellules HUVEC (GFP et RFP) ont été achetées chez Angio-Proteomie (Boston, MA, US) et cultivées dans un milieu EndoGM complet (Angio-Proteomie). Les cellules ont été utilisées à des passages 5-7 pour les expériences. Les fibroblastes ont été cultivés dans un milieu DMEM supplémenté en GlutaMAX (Gibco, Grand Island, NY, US), et les cellules ont été utilisées à des passages 6-8 pour les expériences. Les sphéroïdes modèles (constitués de cellules HUVEC et de fibroblastes) ont été formés dans une plaque 96 puits en U, avec une surface d'adhésion ultra-faible (Corning, NY, US). Ces plaques à puits sont spécialement adaptées pour la génération de sphéroïdes. Pour ce faire, les fibroblastes et les HUVEC ont été mélangés au ratio 1 pour 1 à 5000 cellules par puits (2500 HUVEC et

2500 fibroblastes) dans 150 µl de milieu de culture. Après 24 h en plaque à puits, un sphéroïde est formé et peut être introduit dans le dispositif. Un mélange de milieu de culture CnT-ENDO / CnT-Prime (CELLnTEC, Bern, Suisse) 1% Pen-Strep (PAN Biotech, Aidenbach, Allemagne) a été utilisé pour la perfusion microfluidique continue. Les cellules RFP-HUVEC ont été suspendues dans l'hydrogel à une concentration de 6×10^6 cellules par ml.

Les organoïdes de vaisseaux sanguins humains (BVO pour Blood Vessel Organoids en anglais) ont été générés à partir de cellules souches humaines pluripotentes induites (hiPSC) selon un protocole déjà décrit dans une publication passée²⁸. Brièvement, les colonies de cellules souches ont été récoltées à l'aide d'Accutase (SigmaAldrich) pour obtenir une suspension cellulaire unique. Pour s'assurer que les organoïdes seraient d'une taille appropriée pour entrer dans les microcanaux à profil carré de 800 µm x 800 µm de la puce utilisée pour les expériences, des plaques AggreWell™400 (STEMCELL Technologies) ont été utilisées. Chaque puits de la plaque contient 1200 micropuits d'un diamètre de 400 µm. 600000 cellules souches uniques ont étéensemencées par puits (500 cellules/micro-puits) dans un milieu d'agrégation contenant 50 µM de Y27632 (STEMCELL technologies). L'induction du mésoderme a été déclenché directement dans les plaques AggreWell™400 en changeant soigneusement le milieu avec une pipette et en veillant à ne pas perturber les agrégats de cellules dans les micropuits. Pour l'incorporation du Collagen I-Matrigel, les organoïdes ont été récoltés dans la plaque AggreWell™400 et déposés dans une plaque 12 puits (environ 100 organoïdes/12 puits), puis découpés et isolés dans des plaques 96 puits en U à faible adhésion 4 à 5 jours après l'intégration. Aucune modification n'a été apportée aux milieux de différenciation des organoïdes. Les organoïdes ont été maintenus en culture dans un milieu de différenciation contenant 15 % de FBS (Gibco), 100 ng/ml de VEGF-A et 100 ng/ml de FGF-2. Les organoïdes ont légèrement grandi après avoir été retirés de la plaque AggreWell™400, ainsi 4 jours après la culture en plaque 12 puits, des organoïdes d'un diamètre de 500-800 µm adaptés aux dimensions de la puce microfluidiques ont été sélectionnés (Fig. 2). Une fois injectés dans la puce microfluidique selon les protocoles décrits plus haut, un mélange du milieu de différenciation avec les milieux CnT-ENDO et CnT Prime Fibroblast a été utilisé (ratio 1:1:1).

Organoïdes de vaisseaux sanguins (BVO), 500 cellules par puits

Maturation dans Collagen I - Matrigel



Mature (après découpe)

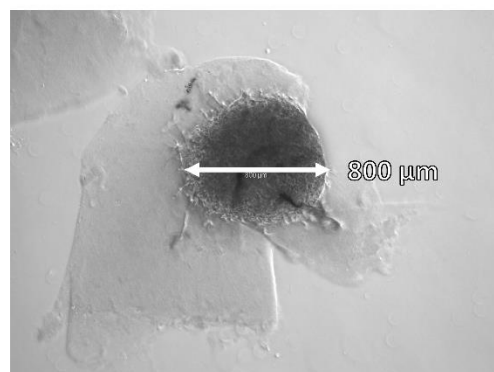


Figure 2 : Génération des organoïdes de vaisseaux sanguins.

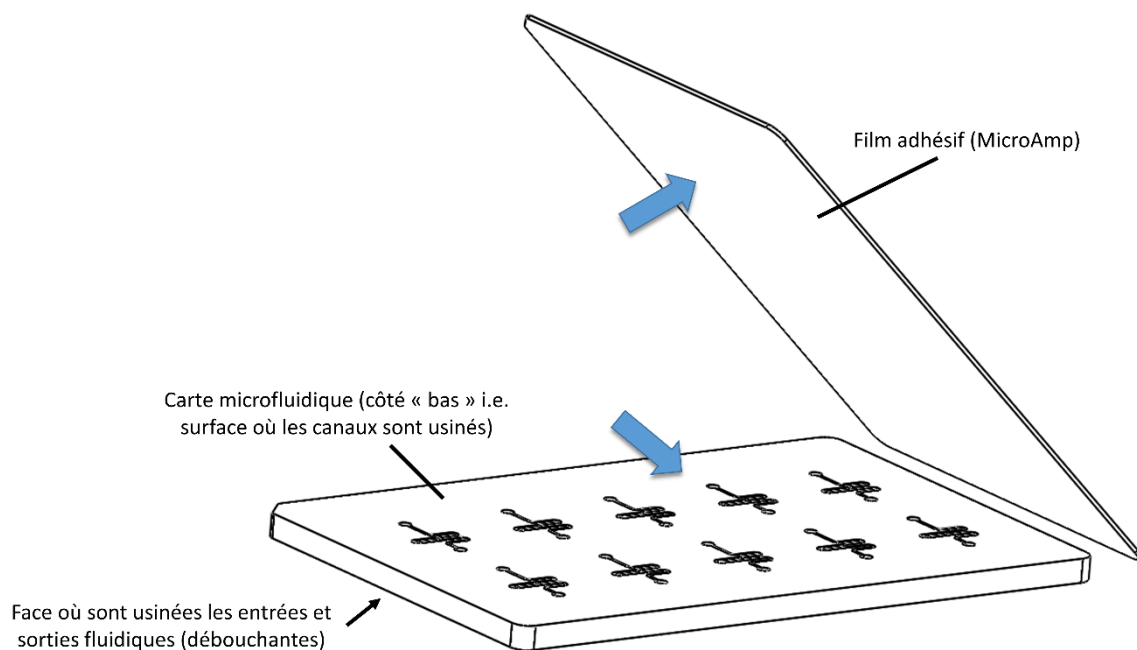
2.3 Préparation de l'hydrogel

Un hydrogel de fibrine composé à 6,6 mg/ml de fibrinogène, 0,15 TIU/ml d'aprotinine, 2,5 mM de CaCl₂ et 1 U/ml de thrombine a été préparé dans une solution saline tamponnée HEPES (Sigma-Aldrich,

Taufkirchen, Allemagne) et a été utilisé dans toutes les expériences. Après avoir ajouté la thrombine (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) dans le mélange, toutes les procédures ont été effectuées rapidement pour éviter une gélification prématurée.

2.4 Fabrication du dispositif

Les fichiers de conception assistée par ordinateur (CAO) de la puce ont été générés à l'aide de Solidworks 2018 (Dassault Systèmes, Vélizy-Villacoublay, France). Les puces microfluidiques ont été fabriquées en copolymère d'oléfine cyclique (COC) en raison de sa faible auto-fluorescence, de sa forte résistance chimique et de sa faible absorption de petites molécules. Les canaux microfluidiques ont été directement usinés sur une plaque de COC (TOPAS, USA) par fraisage de haute précision (équipement DATRON M7HP). La puce (84x54 mm²) comprend 10 canaux microfluidiques identiques. Les canaux à section carrée présentent les dimensions suivantes : 400 µm x 400 µm pour les expériences avec des sphéroïdes mésenchymateux, et 800 µm x 800 µm pour les expériences avec des organoïdes de vaisseaux sanguins. Les canaux microfluidiques ont été scellés avec un film adhésif MicroAmp (Applied Biosystems, Foster City, USA) (Fig. 3).



2.5 Imagerie cellulaire

La puce microfluidique a été imagée à l'aide d'un microscope inversé Olympus IX50 tous les jours pendant la durée de l'expérience. Les images ont été prises en contraste de phase (bright field), en fluorescence verte et en fluorescence rouge, avec des objectifs 4x, 0,1 O.N. et 10x, 0,3 O.N., équipés d'une caméra CCD pilotée par le logiciel Point Grey. Les images montrant l'anastomose entre RFP- et GFP-HUVEC (Fig. 11) ont été prises à l'aide d'un microscope inversé (Zeiss Observer Z1) avec un objectif 20x, 0,4 O.N. équipé d'une caméra CCD mono Axiocam 503 et de la technologie ApoTome (sectionnement optique par illumination structurée). Les images du réseau montré en Fig. 10b ont été prises à l'aide d'un système confocal à disque rotatif, composé d'un microscope inversé EclipseTi-E

Nikon, équipé d'une tête confocale CSUX1-A1 Yokogawa, d'une caméra EMCCD Evolve (Roper Scientific, Princeton Instruments) et d'un objectif 20x, 0,75 O.N., pilotée par le logiciel MetaMorph (Universal Imaging). Les images des réseaux vasculaires et des organoïdes de vaisseaux sanguins ont été prises à l'aide d'un microscope confocal, Zeiss LSM800, avec des objectifs 10x, 0,3 O.N. et 63x, 1,4 O.N. (ce dernier uniquement pour la mise en évidence de la lumière des vaisseaux HUVEC). Le flux dans les réseaux vasculaires a été évalué au cours de la deuxième semaine de culture en perfusant des microbilles fluorescentes en polystyrène (Thermo Fisher Scientific Fluoro-Max Fluorescent Beads) dans le canal serpentin. Les images ont été prises à 15 Hz en utilisant le microscope inversé Olympus IX50 décrit ci-dessus. Les traitements d'images ont été réalisés grâce au logiciel ImageJ/Fiji (National Institute of Health, New York, NY, USA).

2.6 Microscope à fluorescence à feuille de lumière

Nous avons utilisé dans ce projet le microscope à fluorescence à feuillet de lumière (light sheet) « fait maison » déjà décrit au chapitre précédent. La nappe de lumière a été générée par un laser Ar de 488 nm, focalisée par une lentille cylindrique de 100 mm de longueur focale. Le signal de fluorescence généré au niveau du plan illuminé a été capté par l'objectif (Mitutoyo M Plan APO SL 20X, 0.28 O.N.) placé à 90° par rapport au chemin d'excitation de façon à obtenir des vues transverses des canaux microfluidiques. La puce microfluidique a été montée sur un support conçu sur mesure et fixé à une platine contrôlée par ordinateur (Fig. 4).

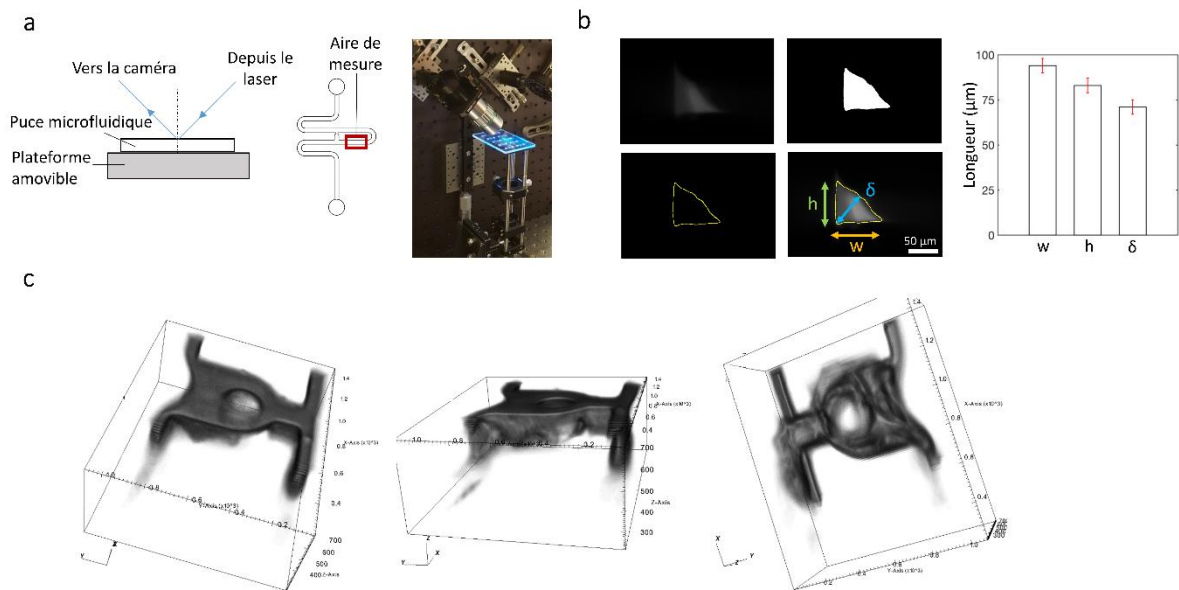


Figure 4 : Montage du microscope light sheet au laboratoire et imagerie de la puce microfluidique. **a.** Schéma et photographie du dispositif expérimental. Des z-stacks de 100 images ont été acquises dans l'aire de mesure pour quantifier le dépôt d'hydrogel fluorescent avec un pas de 10 microns le long du canal microfluidique en utilisant une platine automatisée, **b.** Images du dépôt d'hydrogel dans un coin du microcanal montrant l'image brute, l'image du masque de segmentation basé sur la méthode Otsu, le contour de segmentation et la superposition de l'image brute et du masque. Les dimensions des dépôts d'hydrogel dans une section transversale du canal, à savoir la hauteur (h), la largeur (w) et la diagonale, le diamètre de Feret (δ), ont été recueillies. Les dimensions représentent la moyenne \pm s.d. et correspondent à une moyenne faite sur 20 images de la surface du bas de la puce microfluidique (côté MicroAmp), acquises à divers endroits le long du canal microfluidique, **c.** Vues 3D de la distribution du gel fluorescent dans le piège microfluidique en forme de U. La partie plus claire au centre du piège

correspond à une bulle d'air piégée dans le gel. Les représentations 3D du volume du piège ont été réalisées à l'aide du logiciel VisIt. Temps d'exposition : 40 ms. Puissance du laser : 3 mW.

2.7 Immunomarquage sur puce

Pour l'immunomarquage, les cellules et les organoïdes ont été fixés en perfusant du paraformaldéhyde 4 % (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Allemagne) pendant 1 h à température ambiante à travers le microcanal, puis bloqués avec un tampon de blocage contenant 3 % de FBS, 1 % de BSA, 0,5 % de Triton-X-100 et 0,5 % de Tween pendant 2 h à température ambiante. Les anticorps primaires (CD31, lapin, Abcam clone EP3095 ab134168) ont été dilués à 1:300 dans le tampon de blocage et ont circulé pendant une nuit dans la puce microfluidique à 4°C. Après un lavage de 30 minutes dans du PBST (0,05% Tween), des anticorps secondaires conjugués Cy3 (Donkey Anti-Rabbit, Jackson ImmunoResearch Inc.) ont été dilués dans le tampon de blocage à 1 :300 et perfusés dans les microcanaux pendant 2 h à température ambiante. Après un lavage de 30 min dans du PBST, une marquage nucléaire Hoechst a été effectué selon un protocole standard.

2.8 Analyse des réseaux endothéliaux

Les images au microscope confocal ont été réalisées en utilisant la fonction z-stack avant d'avoir été projetées en 2D dans ImageJ et analysées à l'aide du plugin Angiogenesis Analyzer en utilisant les paramètres par défaut²⁹. Les réseaux endothéliaux forment des segments interconnectés par des jonctions et peuvent être quantifiés selon une multitude de paramètres. Quatre métriques ont été sélectionnées pour cette étude, à savoir le nombre de jonctions, le nombre de mailles, le nombre de segments et la longueur totale des segments dans l'aire du réseau imagée (Fig. 5).

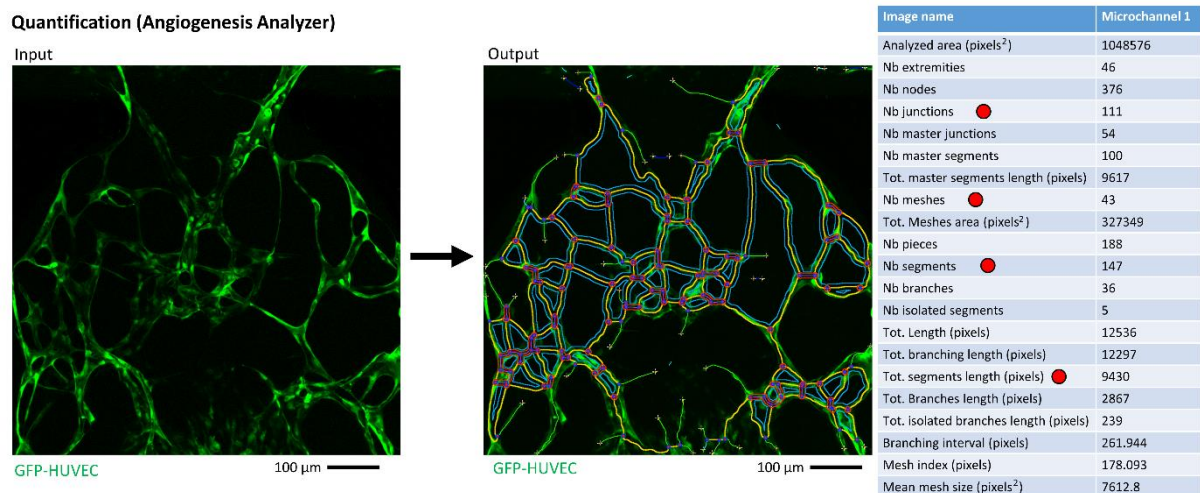


Figure 5 : Quantification des réseaux endothéliaux formés en utilisant le plugin Angiogenesis Analyzer. Des z-stacks confocaux des microcanaux ont été pris dans les différentes conditions de culture. Les z-stacks ont été pris à la limite de la profondeur confocale au sein de chaque échantillon, soit près de 200 μm par échantillon, ce qui représente approximativement le même volume pour chaque circuit microfluidique analysé. Ces z-stacks ont ensuite été projetés dans ImageJ pour obtenir une projection d'intensité maximale. Les paramètres par défaut du plugin Angiogenesis Analyzer ont été utilisés. Quatre paramètres différents (points rouges) représentatifs de la morphologie du réseau ont été utilisés.

2.9 Analyse statistique

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne \pm s.d. (écart-type) comme indiqué dans les légendes des figures. Les tests statistiques ANOVA à deux voies associés à des tests de comparaisons

multiples de Šidák, ainsi que les t -tests non appariés pour les comparaisons entre les conditions statique et dynamique, ont été réalisés à l'aide du logiciel GraphPad Prism 9 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Les valeurs- P exactes sont indiquées sur les figures.

3 Résultats

3.1 Conception d'un dispositif microfluidique pour le piégeage précis d'organoïdes et de leur micro-environnement

Nous avons entrepris de concevoir un dispositif microfluidique qui soit facile d'utilisation, robuste et automatisé. Une puce microfluidique a été fabriquée en COC, un matériau qui garde ses propriétés mécaniques intactes sur le long terme, convient à la production de masse, qui possède les qualités optiques souhaitées pour l'imagerie, ainsi qu'une faible absorption des substances chimiques³⁰. La puce a été conçue sur la base des principes de piégeage hydrodynamique existants³¹, mais avec quelques modifications en considération des diamètres des organoïdes et des processus d'injection déjà discutés au chapitre précédent (Fig. 6). Un organoïde par circuit microfluidique a ainsi pu être encapsulé au sein son micro-environnement dans le piège.

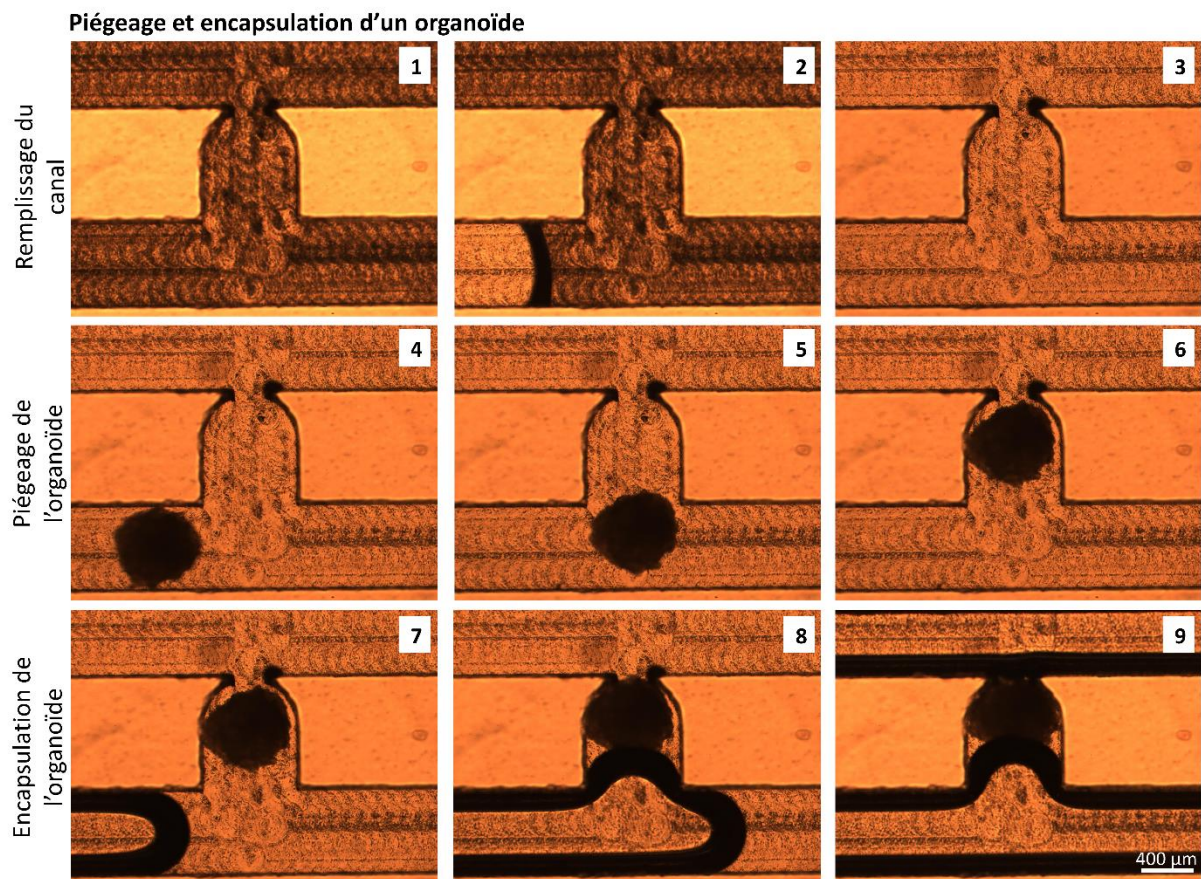


Figure 6 : Validation expérimentale du piégeage et de l'encapsulation d'un organoïde avec la méthode présentée au chapitre précédent. Ici, on montre les différentes étapes du protocole d'injection, de piégeage et d'encapsulation. D'abord, l'hydrogel (à l'état liquide en début d'expérience) remplit le microcanal (remplissage du microcanal, étapes 1-3). Ensuite, l'organoïde est piégé dans le bipasse (piégeage de l'organoïde, étapes 4-6). Enfin, l'air pousse l'hydrogel vers la sortie du microcanal (encapsulation de l'organoïde, étapes 7-9). L'interface hydrogel-air est visible en noir en raison de la différence d'indice de réfraction.

L'efficacité du piégeage hydrodynamique utilisé ici a déjà été démontré dans d'autres études^{32,33}. Cette méthode permet également de positionner délicatement le sphéroïde/l'organoïde en utilisant des débits suffisamment faibles. Chaque sphéroïde/organoïde, incorporé dans un hydrogel de fibrine, a ainsi été positionné avec précision dans le site de piégeage sans aucune altération morphologique apparente (Fig. 7).

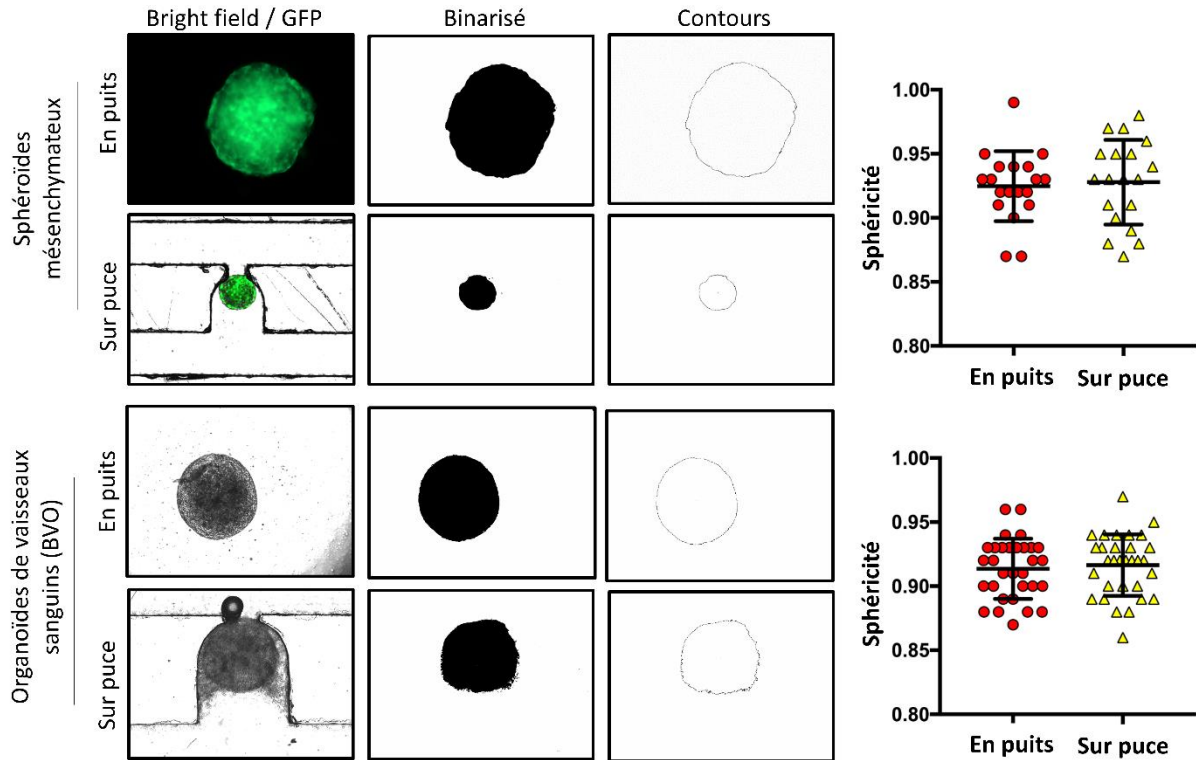


Figure 7 : Les sphéroïdes et les organoïdes ont conservé leur forme sphérique après les processus d'injection, de piégeage et d'encapsulation. Évaluation de la sphéricité des sphéroïdes ($n = 19$) et des organoïdes ($n = 31$) avant et après encapsulation sur puce. Les sphéroïdes et organoïdes ont été préalablement sélectionnés en fonction de leur forme (sphéricité supérieure à 0,8). Sphéroïdes ($n = 19$) : sphéricité $0,92 \pm 0,03$. Organoïdes ($n = 31$) : sphéricité $0,92 \pm 0,02$. Ils ont alors été positionnés précisément dans les sites de piégeage sans aucune altération morphologique apparente, avec une sphéricité maintenue au-dessus de 0,8 (Sphéroïdes ($n = 19$) : sphéricité $0,93 \pm 0,03$. Organoïdes ($n = 31$) : sphéricité $0,92 \pm 0,02$). Les données représentent la moyenne \pm s.d.

Après le piégeage du sphéroïde/organoïde et des cellules endothéliales environnantes, de l'air a été injecté pour pousser l'hydrogel vers la sortie du canal microfluidique. Après la polymérisation de l'hydrogel, la perfusion microfluidique continue avec le milieu de culture a été lancée (Fig. 8c). L'hydrogel et l'air ont été injectés à $Q = 300 \mu\text{l}/\text{min}$. Il convient de noter que l'hydrogel est resté à l'intérieur du site de piégeage en raison d'effets dus à la capillarité, entourant efficacement l'organoïde et minimisant le contact de l'organoïde avec les parois du microcanal, ce qui a entraîné une encapsulation permanente de l'organoïde à l'intérieur du site de piégeage³⁴. En raison de l'effet Landau-Levich-Bretherton³⁵, une fine couche d'hydrogel est également restée le long de la section transversale à section carrée des microcanaux après l'injection d'air, comme expliqué au Chapitre 2 (Fig. 8d). Nous avons utilisé cette propriété pour assurer l'endothélialisation du canal serpentin. Un microscope à fluorescence à feuillet de lumière (light sheet « maison » décrit au chapitre précédent) a été utilisé pour observer la structure tridimensionnelle du dépôt d'hydrogel près du site de piégeage et le long du microcanal (Fig. 8d et e). Par rapport au microscope confocal, ce montage « light sheet » développé par Pierre Blandin, Caroline Bissardon et Xavier Mermet du LSIV (Laboratoire Systèmes d'Imagerie pour le

Vivant) présente l'avantage de pouvoir imager en quelques minutes une large zone du canal microfluidique.

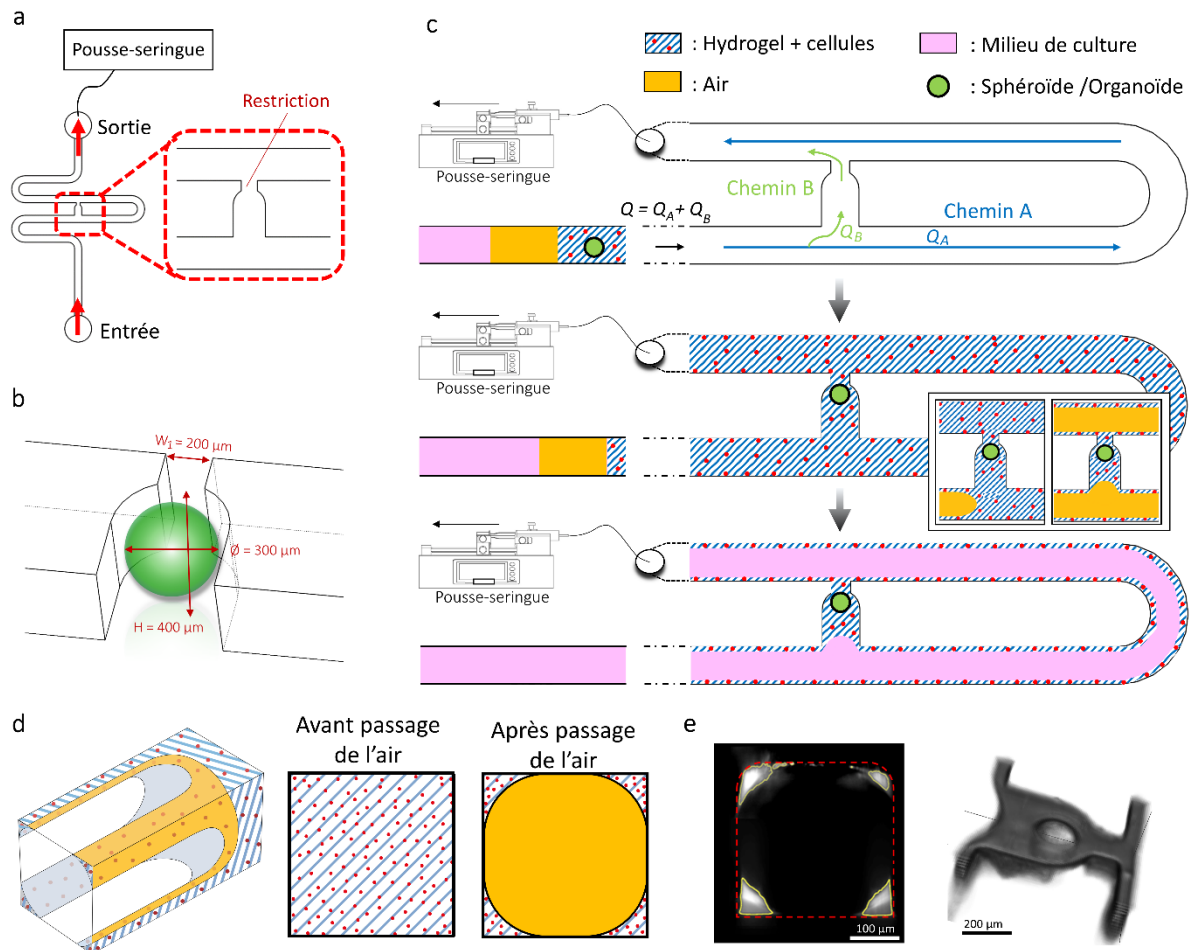


Figure 8 : Vue d'ensemble du dispositif microfluidique et aperçu des configurations de mise en culture. **a.** Vue de dessus du circuit microfluidique. Un pousse seringue est connecté à la sortie du canal pour assurer l'injection des différentes phases et la perfusion microfluidique continue, **b.** Vue schématique tridimensionnelle de la zone de piégeage. Ici, le site de piégeage est occupé de manière par un agrégat de $300\ \mu\text{m}$ de diamètre, **c.** Schéma montrant une vue d'ensemble du protocole d'injection et de mise en culture. Au départ, l'hydrogel contenant un organoïde et les cellules endothéliales est injecté. Avant la polymérisation de l'hydrogel, de l'air est introduit pour positionner l'hydrogel et les cellules endothéliales. Enfin, le milieu de culture peut être introduit pour une perfusion continue du canal microfluidique et de l'organoïde piégé, **d.** Vues schématiques en 3D et en coupe transversale du microcanal montrant le passage de l'air et le dépôt d'hydrogel correspondant, **e.** Vue expérimentale en coupe transversale (à gauche) du canal microfluidique montrant le dépôt d'hydrogel dans le piège et dans les coins du canal et rendu 3D (à droite).

3.2 Formation de réseaux endothéliaux interconnectés

Pour démontrer la pertinence biologique de notre système, nous avons entrepris de former des réseaux endothéliaux dans les puces microfluidiques. Nous avons utilisé des agrégats cellulaires composés de fibroblastes et de cellules HUVEC marquées GFP (vert), appelés ici sphéroïdes mésenchymateux. Une des questions initiales posées dans le cadre de cette thèse concernait l'influence de l'écoulement microfluidique sur le développement des réseaux microvasculaires : l'écoulement joue-t-il un rôle prépondérant dans l'établissement des réseaux microvasculaires sur puce ? Nous avons ainsi examiné les effets de l'écoulement sur la différenciation de ces sphéroïdes en structures vasculaires en les

cultivant seuls dans des conditions statiques (avec changement de milieu tous les jours) ou d'écoulement (Fig. 9a). Nous avons observé une formation accrue de réseaux endothéliaux sous perfusion dynamique, avec une augmentation significative de 4,4, 5,0, 4,8 et 6,5 fois du nombre de jonctions, du nombre de segments, de la longueur totale des segments et du nombre de mailles respectivement, par rapport aux conditions statiques (Fig. 9b). Un premier résultat réside donc dans la démonstration de l'influence de l'écoulement microfluidique dynamique dans la différenciation des sphéroïdes mésenchymateux en des structures ressemblant morphologiquement à des réseaux vasculaires.

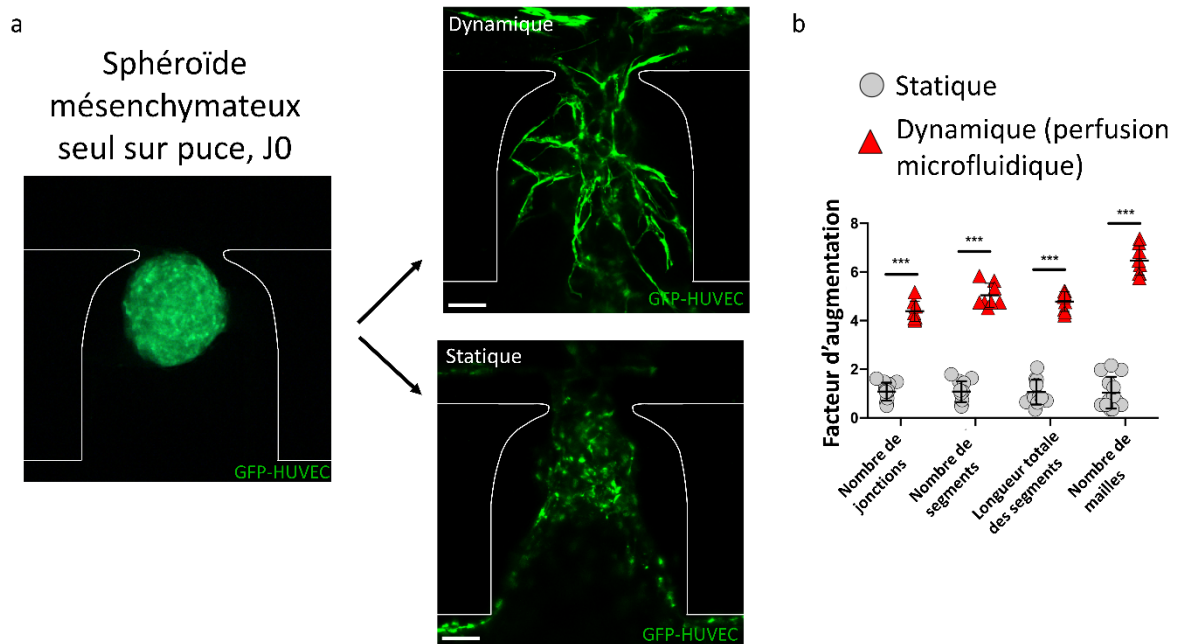


Figure 9 : **a.** Mise en évidence des différences dans le processus d'auto-organisation des cellules GFP-HUVEC des sphéroïdes mésenchymateux cultivés seuls, dans des conditions statique ou d'écoulement dynamique (jour 0 (à gauche) et jour 8 (à droite) après ensemencement), **b.** Quantification du nombre et de la longueur des vaisseaux des réseaux endothéliaux (augmentation par rapport à la condition statique). Les points sur le graphe représentent les résultats de $n = 13$ et $n = 8$ (conditions statique et dynamique, respectivement) microcanaux indépendants provenant de $n = 3$ expériences indépendantes. Les données représentent la moyenne \pm s.d. La significativité statistique a été attribuée aux valeurs de $P < 0,05$, déterminée par un t-test non apparié. *** $P < 0.001$. Barres d'échelle, 100 μ m.

Nous avons ensuite cherché à établir des connexions entre les sphéroïdes mésenchymateux et les cellules endothéliales préalablement suspendues dans le gel. Les cellules endothéliales HUVEC des sphéroïdes étaient marquées GFP (vert) et les cellules endothéliales HUVEC suspendues dans le gel avant l'injection étaient marquées RFP (rouge), afin de visualiser directement ces deux populations cellulaires distinctes et d'observer facilement les interactions entre elles. Au jour 0 de culture, les sphéroïdes mésenchymateux ont été injectés dans la puce. Au 3^{ème} jour de culture, nous avons observé un début d'organisation des cellules endothéliales (Fig. 10a), et au 7^{ème} jour de culture, un réseau endothélial tridimensionnel était formé (Fig. 10b). Nous avons également déterminé la prolifération des cellules endothéliales au fil du temps dans les canaux microfluidiques près du site de piégeage en quantifiant la surface de l'image couverte par les HUVEC (Fig. 10c). Grâce à la présence de fibroblastes dans les agrégats de cellules mésenchymateuses, les cellules GFP-HUVEC (vert) se sont propagées rapidement. Les RFP-HUVEC (rouge), initialement situées dans les coins du canal principal, ont également proliféré et revêtu les parois des microcanaux.

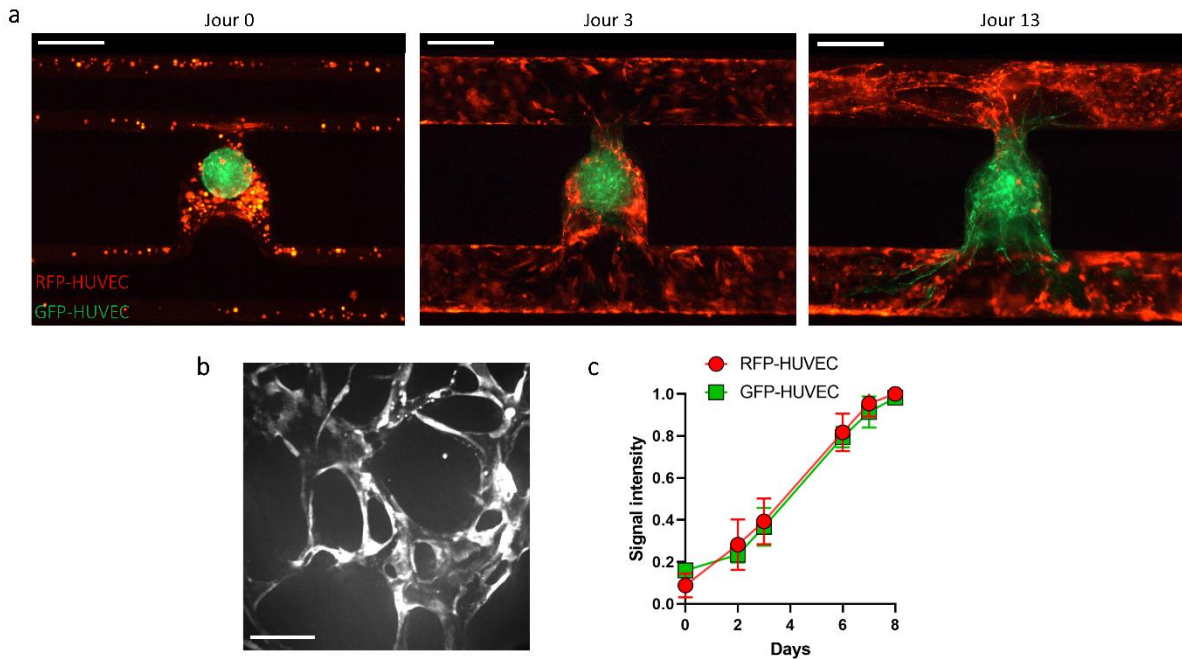


Figure 10 : Connexion des cellules RFP-HUVEC (rouge) dans l'hydrogel de fibrine avec les cellules GFP-HUVEC (vert) du sphéroïde mésenchymateux. **a.** Evolution au fil du temps du réseau endothélial. Les cellules RFP-HUVEC suspendues dans le gel sont visualisées en rouge, les cellules GFP-HUVEC provenant des sphéroïdes mésenchymateux sont visualisées en vert. On note la formation de réseaux endothéliaux au fil du temps, stables jusqu'à la fin de la période d'observation (jour 13 après ensemencement), **b.** Mise en évidence du caractère tridimensionnel du réseau endothélial ainsi formé au 7^{ème} jour de culture. L'image est représentative des expériences menées dans $n = 12$ microcanaux indépendants, **c.** Quantification de la prolifération des cellules RFP-HUVEC et GFP-HUVEC en fonction du temps. L'intensité des signaux a été normalisée par le signal d'intensité maximale de chaque série d'images. La zone imagée dans le canal microfluidique correspond à celle montrée en (c) ($n = 6$ microcanaux indépendants). Les données représentent la moyenne \pm s.d. Aucune différence significative n'a été trouvée dans les proliférations cellulaires, déterminé par un test ANOVA à deux voies associé à des tests de comparaisons multiples de Šidák. Barres d'échelle, 400 μ m (**a**) et 50 μ m (**b**).

Enfin, nous avons examiné si les RFP-HUVEC en suspension dans le gel se connectaient aux sphéroïdes mésenchymateux de sorte à former un modèle de sphéroïde vascularisé. De façon remarquable, nous avons observé une anastomose spontanée entre les vaisseaux endothéliaux RFP-HUVEC et l'endothélium des sphéroïdes mésenchymateux, établissant ainsi un réseau interconnecté (Fig. 11). Notre méthode nous a donc bien permis d'établir des réseaux endothéliaux *via* des connexions entre les cellules endothéliales suspendues dans le gel et les cellules endothéliales des sphéroïdes.

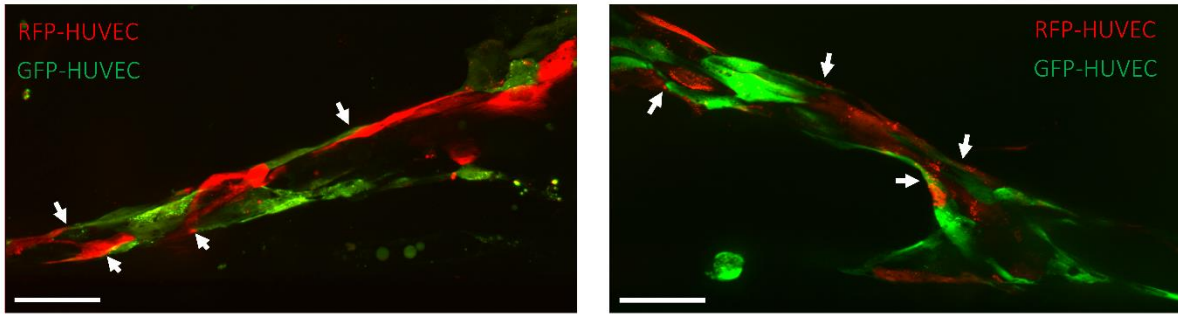


Figure 11 : Anastomoses entre les cellules RFP-HUVEC et GFP-HUVEC indiquées par les flèches blanches. Barres d'échelle, 50 μm .

3.3 Fonctionnalité du réseau endothélial

Pour démontrer la fonctionnalité du réseau endothélial interconnecté, nous avons réalisé des perfusions de microbilles fluorescentes rouges. Pour visualiser l'écoulement possible par tous les chemins possibles dans le réseau, des billes de 1 μm de diamètre ont été injectées à un débit $Q_+ = 10 \mu\text{l}/\text{min}$ dans l'organe-sur-puce au 13^{ème} jour de culture (Fig. 12a). Il est important de noter que la majorité des billes ont traversé le réseau endothélial dans la direction principale de perfusion (chemin B). Comme attendu, certaines billes ont également été perfusées par la voie de perfusion secondaire (chemin A). Dans la présente architecture en effet, l'écoulement ne peut être précisément contrôlé dans chacune des deux branches du circuit microfluidique de façon indépendante. Cette limitation fera l'objet du Chapitre 4. Il convient de noter que, comme l'expérience a été réalisée à un débit constant, la vitesse d'une microbille est inversement proportionnelle à la section qu'elle traverse, d'où une diminution de la vitesse dans les régions sans réseau endothélial. Il en résulte un signal fluorescent intense dans les coins inférieurs gauche et supérieur droit de la zone imagée.

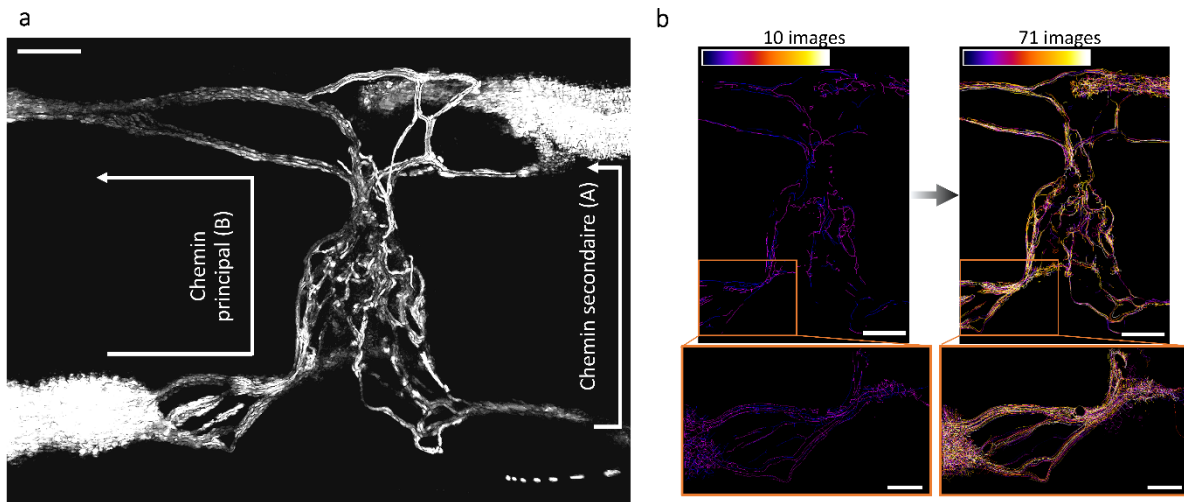


Figure 12 : Fonctionnalité des réseaux endothéliaux formés. **a**. Projection du maximum d'intensité sur un film de 71 images, mettant en évidence les traces des microbilles traversant le réseau. Seules les billes en mouvement ont été gardées après un processus de soustraction d'images (voir Annexe A), **b**. Somme des images binarisées et colorisées montrant la perfusion de billes dans le temps (voir Annexe A). . Diamètre des billes, 1 μm . Barres d'échelle, 200 μm (**a** et **b**), 100 μm (encadrés **b**).

Nous avons aussi analysé la distribution des microbilles dans le réseau endothélial au fil du temps, en comptant le nombre de pixels dans chaque image des films binarisés, correspondant aux mouvements

des microbilles. Il est intéressant de noter que les microbilles ont perfusé l'ensemble du réseau endothélial sans qu'aucune zone particulière ne semble être privilégiée (Fig. 12b et 13).

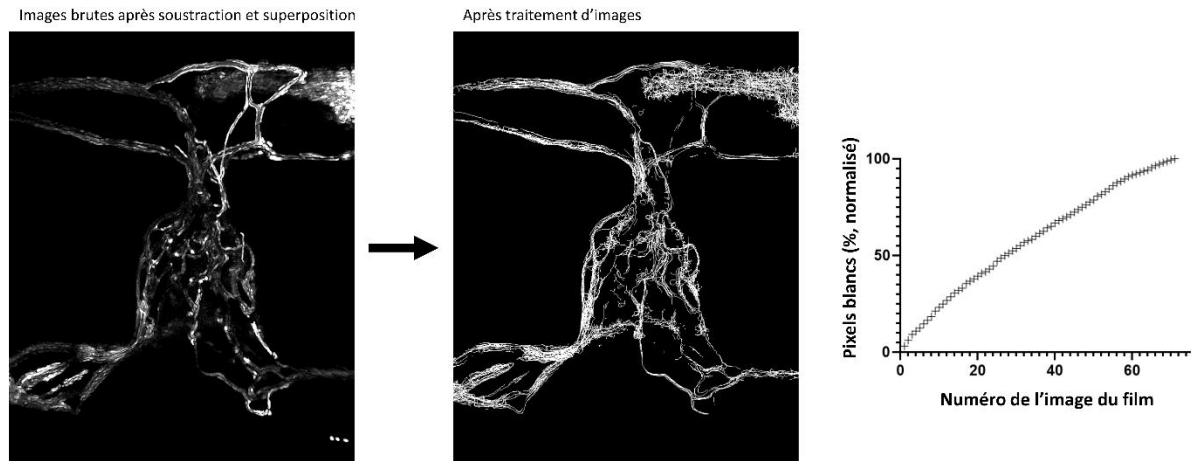


Figure 13 : Traitement d'images des films de perfusion des microbilles à travers un réseau endothélial. Seules les traces des microbilles ont été conservées en utilisant un script de soustraction d'images consécutives sur ImageJ (Annexe A). Les images ont ensuite été traitées en utilisant les fonctions Skeletonize et Binarize sur ImageJ, et superposées. Le nombre de pixels blancs, correspondant aux mouvements des microbilles, augmente régulièrement au cours du film, démontrant que les microbilles ne passent pas en priorité par un vaisseau particulier, mais explorent l'intégralité du réseau.

Dans les microcanaux présentés dans les Fig. 14a et b, un faible nombre de billes a été introduit à un débit plus faible de $Q = 0,1 \mu\text{l}/\text{min}$ afin de visualiser les mouvements des microbilles individuelles (voir également la vidéo supplémentaire 3). La superposition des microbilles suivies (signaux rouges) et du signal fluorescent vert provenant de l'endothélium du sphéroïde mésenchymateux démontre la bonne perfusion du réseau. Ces résultats démontrent que les réseaux endothéliaux formés dans la puce en serpentins sont fonctionnels et facilement perfusables.

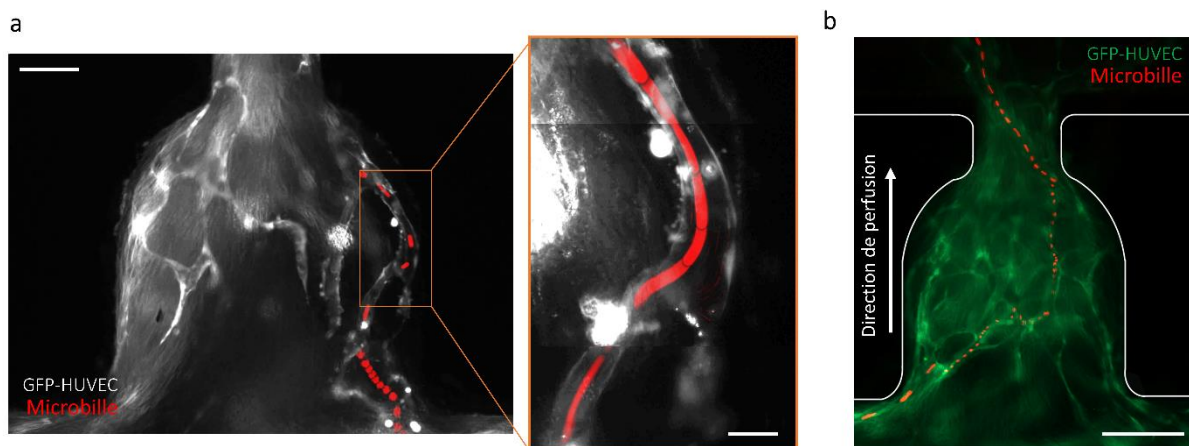


Figure 14 : **a-b**. Suivi d'une microbille individuelle (rouge) traversant deux réseaux endothéliaux différents. L'encadré (**a**) montre l'assemblage de trois films pris dans la zone indiquée à un grossissement plus élevé. Pour une meilleure visualisation, les cellules RFP-HUVEC ne sont pas représentées sur ces images. Diamètre des billes, $4,8 \mu\text{m}$ (**a**), et $3,2 \mu\text{m}$ (**b**). Barres d'échelle, $100 \mu\text{m}$ (**a**), $200 \mu\text{m}$ (**b**) et $20 \mu\text{m}$ (encadré **a**).

Enfin, nous avons étudié la pertinence physiologique de notre plateforme microfluidique. Les flux observés et filmés dans les réseaux ont été caractérisés en suivant des microbilles fluorescentes lors de leur traversée du réseau endothélial. En fonction du débit imposé par le pousse-seringue, les microbilles se déplaçant dans les vaisseaux ont présenté des vitesses d'écoulement allant de $v_{\min} = 100 \mu\text{m/s}$ à $v_{\max} = 7500 \mu\text{m/s}$. En supposant un écoulement laminaire, on peut déduire de ces valeurs le taux de cisaillement dans le fluide au niveau des parois des vaisseaux, qui est donné par $\dot{\gamma}_w = \frac{4\bar{v}}{R}$, où R est le rayon du vaisseau considéré et \bar{v} la vitesse moyenne du fluide dans le vaisseau. En effet, en modélisant un vaisseau endothélial par un tube cylindrique creux selon un axe z , le profil de vitesse d'un écoulement en son sein est donné par l'équation de Poiseuille : $v(r) = \frac{R^2}{4\mu} \left| \frac{dp}{dz} \right| \left(1 - \frac{r^2}{R^2} \right)$. Le débit peut alors être exprimé de la sorte : $Q = \int v(r) dA$ avec $dA = 2\pi r dr$. Donc $Q = \int_0^R \frac{R^2}{4\mu} \left| \frac{dp}{dz} \right| \left(1 - \frac{r^2}{R^2} \right) 2\pi r dr = \frac{2\pi R^4}{8\mu} \left| \frac{dp}{dz} \right|$. Ainsi, la vitesse moyenne peut être exprimée de la sorte : $\bar{v} = \frac{Q}{\pi R^2} = \frac{R^2}{8\mu} \left| \frac{dp}{dz} \right|$. Finalement, on obtient le taux de cisaillement : $\dot{\gamma}_w = \left. \frac{\partial v}{\partial r} \right|_{r=R} = \frac{4\bar{v}}{R}$.

Ainsi en utilisant des débits allant de Q_- à Q_+ , les valeurs accessibles de $\dot{\gamma}_w$ varient de 27 à 2000 s^{-1} . Les vitesses moyennes des billes (\pm s.d.) observées lors de la perfusion du réseau à Q_- , et les taux de cisaillement associés, étaient de $\bar{v} = 502 \pm 305 \mu\text{m/s}$ et $\dot{\gamma}_w = 134 \pm 81 \text{ s}^{-1}$ ($n = 4$ billes suivies individuellement). Les vitesses moyennes (\pm s.d.) observées lors de la perfusion du réseau à Q_+ , et les taux de cisaillement associés, étaient de $\bar{v} = 2689 \pm 531 \mu\text{m/s}$ et $\dot{\gamma}_w = 531 \pm 142 \text{ s}^{-1}$ ($n = 4$ billes suivies individuellement) (Tableau 1). La gamme de valeurs de flux observée dans notre dispositif est ainsi en adéquation avec les débits mesurés dans les capillaires humains, qui correspondent à des vitesses d'écoulement de $\bar{v} = 500\text{-}1500 \mu\text{m/s}$ et des taux de cisaillement de $\dot{\gamma}_w = 50\text{-}1900 \text{ s}^{-1}$ ^{ref.36}. En définitive, la pertinence physiologique de la perfusion microfluidique ainsi réalisée dans la puce en serpentin est bien démontrée.

Débit ($\mu\text{L}/\text{min}$)	Vitesse ($\mu\text{m/s}$)		Taux de cisaillement (s^{-1})	
	Sur puce	Physiologique	Sur puce	Physiologique
$Q_- = 0.1$	$v_{\min} = 100$ $\bar{v} = 502 \pm 305$	$v_{\min} = 500$	$\dot{\gamma}_{w\min} = 26$ $\dot{\gamma}_w = 134 \pm 81$	$\dot{\gamma}_{w\min} = 50$
$Q_+ = 10$	$\bar{v} = 2689 \pm 531$ $v_{\max} = 7500$	$v_{\max} = 1500$	$\dot{\gamma}_w = 531 \pm 142$ $\dot{\gamma}_{w\max} = 2000$	$\dot{\gamma}_{w\max} = 1900$

Tableau 1. Résumé des différents paramètres relatifs à l'écoulement mesurés dans la puce microfluidique et comparés aux flux mesurés in vivo dans les capillaires sanguins humains.

Le fait d'avoir réussi à former des réseaux microvasculaires de manière fonctionnelle dans ce design original en serpentin est un résultat important de cette thèse. Couplée au processus d'injection et de localisation de l'hydrogel, cette architecture nous a permis de proposer un modèle de sphéroïde vascularisé dans lequel ce dernier est piégé automatiquement dans une zone du circuit microfluidique choisie par l'expérimentateur. Néanmoins, nous avons utilisé un sphéroïde mésenchymateux modèle limité sur le plan biologique. Nous avons donc voulu travailler avec des tissus biologiques plus complexes et plus représentatifs de la physiologie humaine, toujours en gardant à l'esprit l'objectif de vascularisation de ces tissus. Notamment, nous nous sommes posés la question de la possibilité ou non de vasculariser avec un réseau endothélial HUVEC, un tissu qui lui-même ne contient pas de cellules HUVEC. C'est l'objet de la section qui suit.

3.4 Organoïdes de vaisseaux sanguins

Bien que des progrès significatifs aient été réalisés dans la génération d'organoïdes complexes, la convergence de l'ingénierie tissulaire, des technologies à base de cellules souches et de la microfluidique est nécessaire pour relever les défis techniques qui subsistent. En particulier, la vascularisation d'organoïdes demeure un obstacle majeur, dont la résolution pourrait mener à une amélioration de la maturation et de la durée de vie des organoïdes, à la possibilité de générer des organoïdes de taille importante ou encore à l'élucidation de certains processus immunitaires et inflammatoires²⁶.

Pour démontrer l'utilité de notre dispositif, nous avons cultivés dans la puce des organoïdes de vaisseaux sanguins humains (BVO pour Blood Vessel Organoids en anglais) générés à partir de cellules souches pluripotentes humaines (hiPSC pour human induced pluripotent stem cells en anglais). En effet, étant donné notre objectif de vascularisation d'organoïdes-sur-puce, il nous est paru approprié de travailler avec des organoïdes de vaisseaux sanguins. Ainsi nous avons collaboré avec les équipes de Josef Penninger de l'IMBA à Vienne en Autriche, et du Life Sciences Institute à Vancouver au Canada. Le protocole de génération de tels organoïdes²⁸ et leur pertinence physiologique pour la modélisation de la vasculopathie diabétique²⁷ ont récemment été publiés par ces équipes. Brièvement, ces organoïdes s'organisent en réseaux tridimensionnels interconnectés faits de véritables capillaires sanguins, contenant une lumière tapissée de cellules endothéliales, recouverte par des pericytes et une membrane basale prototypique. Ces organoïdes ont été produits à Vienne par Alexandra Leopoldi et Gustav Jonsson, que nous tenons à remercier ici. Les questions auxquelles nous avons tenté de répondre dans cette étude sont les suivantes : un réseau endothélial HUVEC est-il capable de s'organiser autour de l'organoïde piégé ? Si oui, le réseau est-il fonctionnel, et se connecte-t-il aux vaisseaux sanguins de l'organoïde ?

Des organoïdes de vaisseaux sanguins, des cellules GFP-HUVEC (6×10^6 cellules/ml) et des fibroblastes (2×10^6 cellules/ml) ont été incorporés dans l'hydrogel et injectés dans les microcanaux comme décrit précédemment. Les cellules HUVEC se sont auto-organisées en réseaux endothéliaux enlaçant les BVOensemencés après quelques jours de culture (Fig. 15a). Des réseaux HUVEC avec des structures montrant une lumière creuse ont été observés après immunomarquage sur puce au 13^{ème} jour de culture (Fig. 15b).

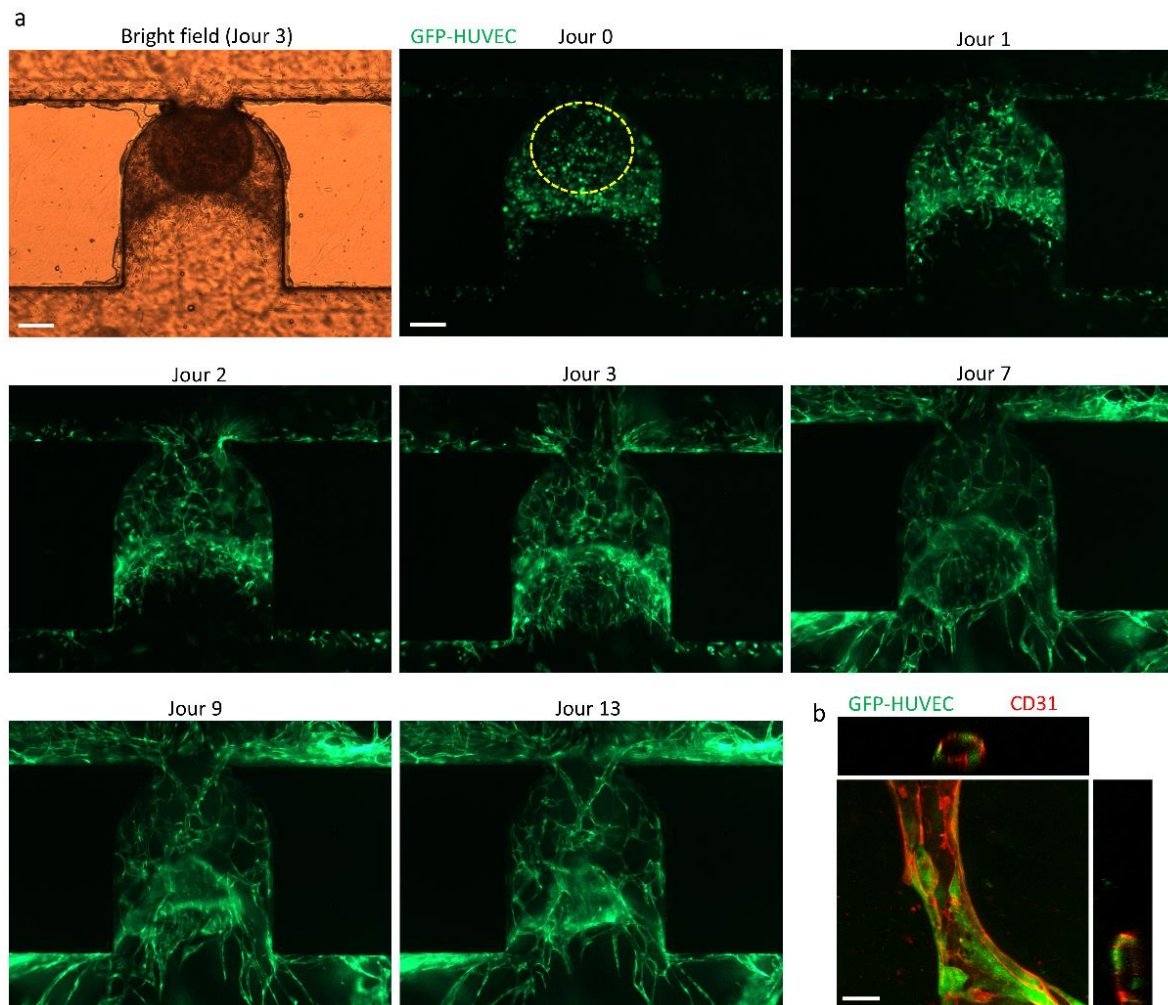


Figure 15 : Établissement de réseaux endothéliaux HUVEC autour d'organoïdes de vaisseaux sanguins. **a.** Évolution de la culture sur puce au fil du temps. Les cellules GFP-HUVEC s'auto-organisent en quelques jours en un réseau endothélial entourant l'organoïde (encerclé en jaune sur la première image à J0, d'après les images en contraste de phase), **b.** Vaisseau du réseau endothélial HUVEC avec des vues orthogonales montrant sa structure en tube creux (lumière). Barres d'échelle, 200 μm (**a**) et 20 μm (**b**).

Afin de révéler la fonctionnalité des réseaux endothéliaux formés, un immunomarquage a été réalisé sur puce. Les tissus ont été fixés et perméabilisés en perfusant du PFA 4% et un tampon de blocage, puis une solution d'anticorps anti-CD31. Le CD31 (ou PECAM1 pour Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule en anglais) est une protéine de type cluster de différenciation exprimée à la surface des cellules endothéliales. Tous les vaisseaux GFP-HUVEC étaient positifs au CD31 (CD31⁺) après immunomarquage, montrant que les réseaux endothéliaux peuvent être facilement perfusés avec la solution d'anticorps anti-CD31 (Fig. 16a). La fonctionnalité des réseaux HUVEC a également été évaluée par la perfusion de microbilles fluorescentes dans les microcanaux après 13 jours de culture (Fig. 16b). Enfin nous avons déterminé la reproductibilité de notre méthode en quantifiant les réseaux développés dans la zone de piégeage après 10 à 14 jours de culture à partir d'expériences indépendantes, c'est-à-dire à partir de différents lots d'organoïdes, de cellules endothéliales et fibroblastes, d'hydrogels et de puces microfluidiques. Le nombre de jonctions, le nombre de segments, la longueur totale des segments et le nombre de mailles ont été évalués à l'aide du plugin Angiogenesis Analyzer d'ImageJ. Aucune différence significative entre les expériences n'a été trouvée (Fig. 16c). Ainsi, ces résultats démontrent la robustesse de notre plateforme microfluidique pour former des réseaux endothéliaux stables de manière reproductible autour des organoïdes de vaisseaux sanguins.

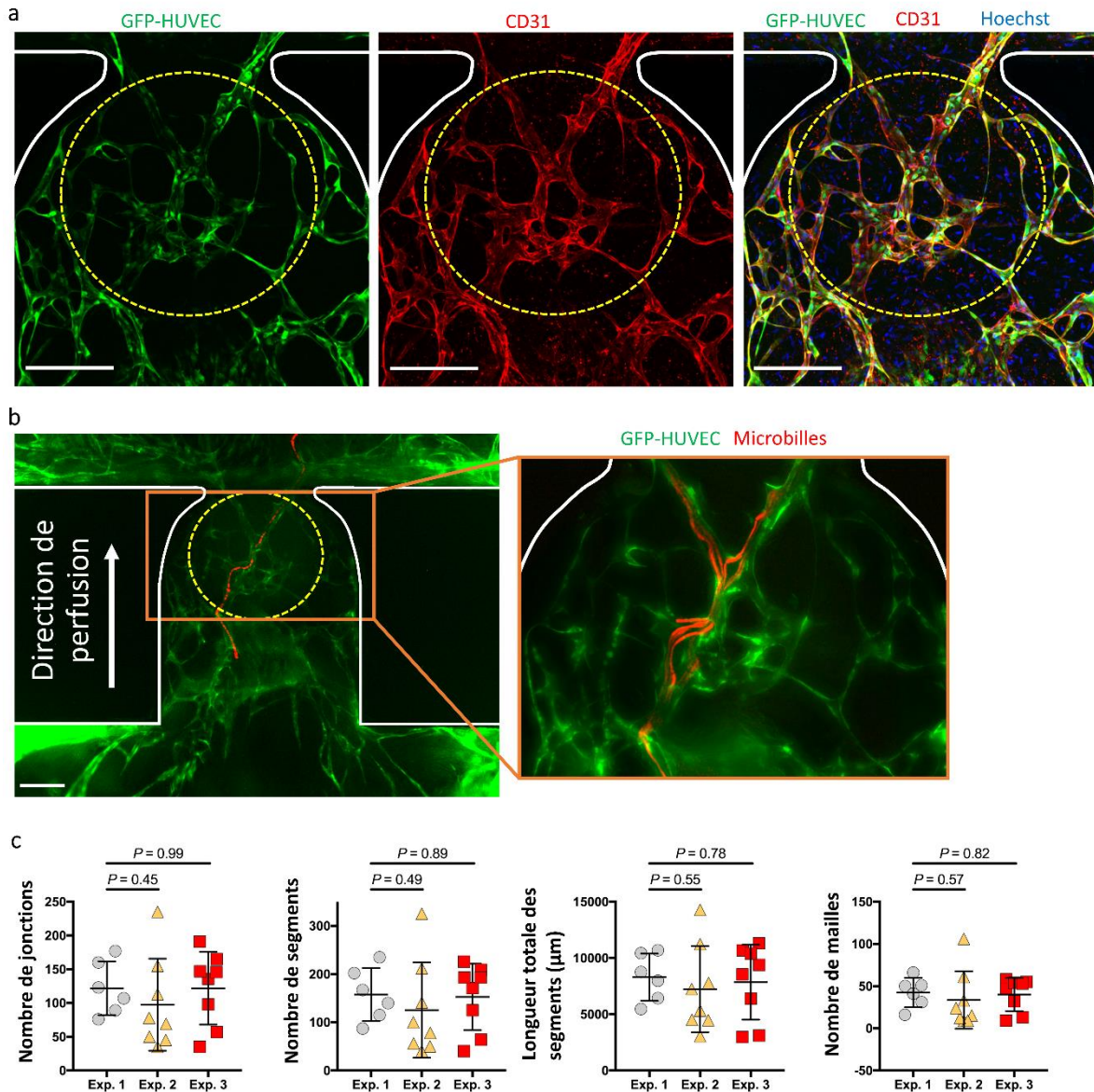


Figure 16 : **a.** Réseau endothélial au 14^{ème} jour de culture imagé après immunomarquage sur puce (expression de CD31 et marqueur nucléaire Hoechst), **b.** Suivi d'une microbille individuelle (rouge) traversant le réseau endothélial (vert). L'encadré montre la perfusion de plusieurs microbilles à plus fort grossissement, **c.** Quantification des réseaux endothéliaux après deux semaines de culture suivant quatre paramètres : (i) nombre de jonctions, (ii) nombre de segments, (iii) longueur totale des segments et (iv) nombre de mailles. Les expériences ont été répétées sur $n = 22$ microcanaux provenant de $n = 3$ expériences différentes et les données sont représentées sous forme de moyenne \pm s.d. Barres d'échelle, 200 μm .

3.5 Anastomose entre réseaux endothéliaux et organoïdes

Nous avons examiné les connexions potentielles entre les réseaux endothéliaux formés par les cellules HUVEC et les BVO. En effet, la vascularisation fonctionnelle d'organoïdes *in vitro* reste un défi majeur dans le domaine³⁷. Si des implants d'organoïdes au sein de souris immunodéficientes ont déjà donné des résultats spectaculaires³⁷⁻³⁹, la possibilité de vasculariser les organoïdes *in vitro* de manière fonctionnelle grâce à la microfluidique offrirait un outil puissant et pratique. Dans notre cas, ayant précédemment montré que les BVO transplantés dans les capsules rénales de souris formaient des connexions fonctionnelles avec le système vasculaire de l'animal²⁷, nous avons testé si nous pouvions

obtenir la même chose dans notre puce microfluidique avec le réseau endothélial HUVEC. Après 10 à 14 jours de culture sur puce, les microcanaux ont été fixés grâce à un protocole dynamique sur puce déjà évoqué où des solutions de PFA 4% et de tampon de blocage ont été perfusées dans les circuits. Les circuits ont alors été immunomarkés en perfusant des solutions d'anticorps anti-CD31 primaires, d'anticorps secondaires et de Hoechst. Le marquage par l'anticorps anti-CD31 (fluorescence rouge) a révélé la présence des cellules endothéliales internes à l'endothélium des BVO (Fig. 17a). De nombreux vaisseaux des BVO ($CD31^{+}GFP^{+}$) ont été observés près des réseaux GFP-HUVEC, indiquant une perfusion fonctionnelle du réseau endothélial HUVEC jusqu'aux vaisseaux des organoïdes (Fig. 17b).

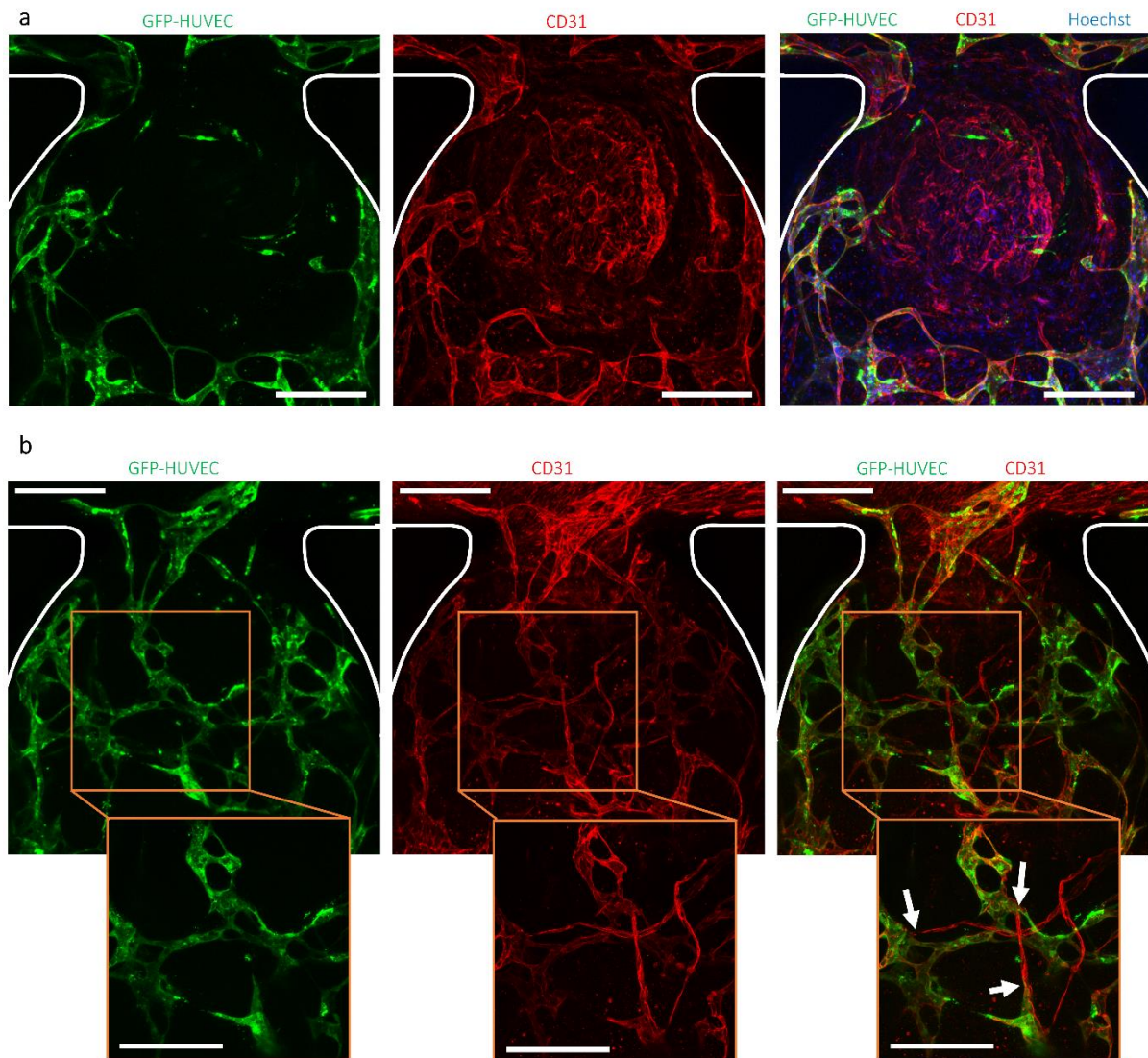


Figure 17 : a-b, Images représentatives des organoïdes-sur-puce vascularisés au 10^{ème} jour de culture, après immunomarquage (expression de CD31 (rouge) et marqueur nucléaire Hoechst (bleu)). L'endothélium des BVO correspondant aux vaisseaux $CD31^{+}GFP^{+}$ est visible au centre du piège (a). Les zones où les vaisseaux des BVO ($CD31^{+}GFP^{+}$) semblent fusionner avec le réseau endothélial HUVEC ($CD31^{+}GFP^{+}$) sont indiquées par des flèches blanches (b). Barres d'échelles, 200 μ m.

Nous avons pu identifier plus précisément plusieurs zones montrant des anastomoses entre le réseau endothélial HUVEC et les vaisseaux du BVO (Fig. 18a). De telles connexions ont aussi été recensés dans des expériences complémentaires menées sur des organoïdes initialement marqués en fluorescence rouge (dTomato, Fig. 18b).

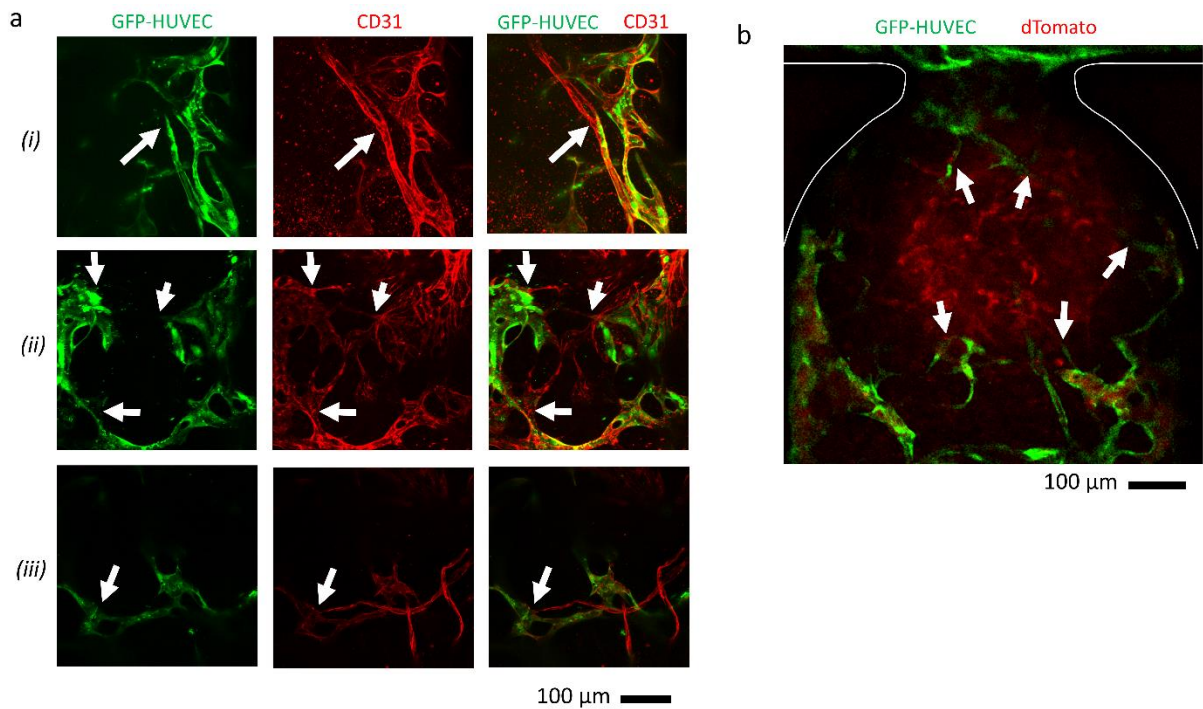


Figure 18 : Anastomose fonctionnelle entre un réseau endothélial HUVEC et des organoïdes de vaisseaux sanguins générés à partir de cellules souches humaines pluripotentes induites. **a.** Trois exemples d'anastomose de vaisseaux HUVEC avec des vaisseaux sanguins de l'organoïde, **b.** Photographie confocale à un z donné montrant des interactions entre le réseau GFP-HUVEC (vert) et un organoïde de vaisseaux sanguins marqué (dTomato, rouge).

Il est à noter que dans les régions où le réseau HUVEC était très dense, les BVO étaient dissimulés derrière ledit réseau, ce qui les rendait difficiles à observer. Nous avons analysé les profils d'intensité lumineuse des z-stacks acquis au microscope confocal en fluorescence verte (correspondant au signal GFP-HUVEC) et rouge (correspondant au signal CD31) pour 6 différents BVO sur puce (Fig. 19). Dans les zones analysées, les courbes de signal rouge et vert se chevauchent dans les premières images des z-stacks (près du bas de la puce) et divergent en atteignant l'organoïde. Cette analyse confirme que les vaisseaux GFP⁺ des BVO ont été perfusés et marqués par l'anticorps anti-CD31.

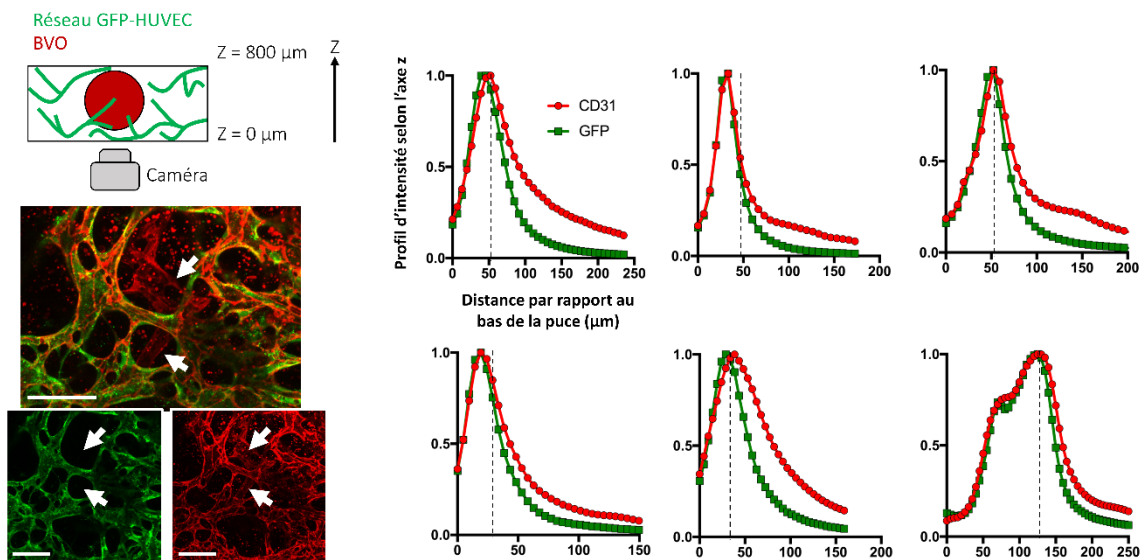


Figure 19 : Projection d'intensité maximale en z de l'image d'un organoïde-sur-puce vascularisé après

immunomarquage (à gauche). L'image est représentative de $n = 6$ microcanaux indépendants provenant de $n = 3$ expériences différentes pour lesquelles les profils d'intensité en fluorescences rouge et verte selon l'axe z sont tracés (à droite). Pour chaque graphique, une ligne noire verticale en pointillés marque la divergence des signaux vert et rouge, révélant l'immunomarquage du BVO au cœur de la puce microfluidique. Barres d'échelles, $100 \mu\text{m}$.

Enfin, nous avons effectué des perfusions de microbilles dans le but de les voir s'écouler dans la structure interne de l'organoïde. Comme les billes s'écoulent de préférence le long des chemins hydrodynamiques de moindre résistance, la probabilité qu'elles pénètrent dans les vaisseaux étroits de l'organoïde est faible. Néanmoins, en perfusant les circuits microfluidiques avec des fortes concentrations en microbilles, nous avons pu démontrer le passage de microbilles de $2 \mu\text{m}$ dans certains larges vaisseaux des organoïdes (Fig. 20a). Des expériences de contrôle ont aussi été réalisées avec des BVO cultivés dans des puits, soit immergés dans le milieu, soit incorporés dans un hydrogel. Les images de contraste de phase ont montré que des bourgeonnements endothéliaux étaient capables de se développer en périphérie de l'organoïde dans l'hydrogel de fibrine après quelques jours de culture. Cependant, l'immunomarquage des BVO cultivés dans ces conditions n'a pas été possible, montrant que ni les anticorps ni les molécules de Hoechst n'ont pu diffuser à travers l'hydrogel, contrairement aux cultures sur puce où les anticorps peuvent atteindre les BVO via le réseau endothélial et ses connexions fonctionnelles avec l'endothélium des BVO (Fig. 20b). Ces résultats montrent que notre méthode permet de connecter des réseaux endothéliaux HUVEC à des organoïdes de vaisseaux sanguins de façon fonctionnelle. Ce système microfluidique représente donc une avancée significative dans le domaine de la vascularisation d'organoïdes-sur-puce et démontre la possibilité de perfuser différentes molécules (médicaments, acides nucléiques, anticorps etc.) ou cellules dans les organoïdes de vaisseaux sanguins.

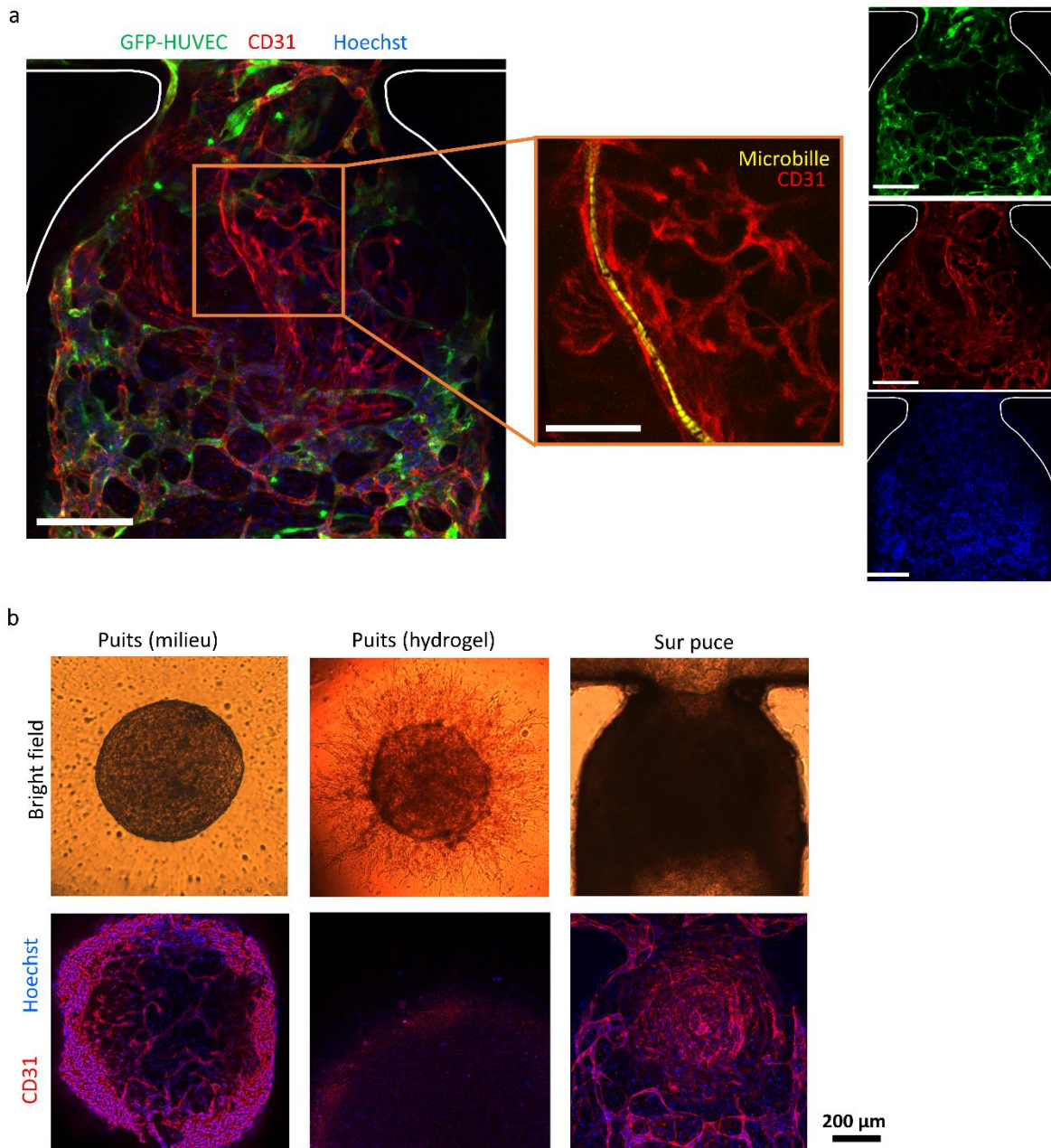


Figure 20 : **a.** Suivi d'une microbille individuelle (jaune) traversant l'endothélium du BVO (à gauche). Les images en fluorescence verte (GFP), rouge (CD31) et bleue (Hoechst) sont montrées indépendamment (à droite), **b.** Images en contraste de phase et en fluorescence de BVO immergés dans un milieu de culture (puits en U), incorporés dans un hydrogel (puits en U) et vascularisés sur puce. Barres d'échelle, 200 μm (**a** et **b**) et 100 μm (encadré (**a**)).

Notons pour conclure que la méthode que nous avons utilisée pour déposer l'hydrogel (qui contient cellules endothéliales et fibroblastes) permet une endothélialisation tout du long du canal microfluidique (Fig. 21). Cette configuration permet ainsi de mimer une artère et une veine (respectivement en amont et en aval du bypass) et ainsi de reproduire la structure artère – capillaires – veine du système vasculaire *in vivo*.

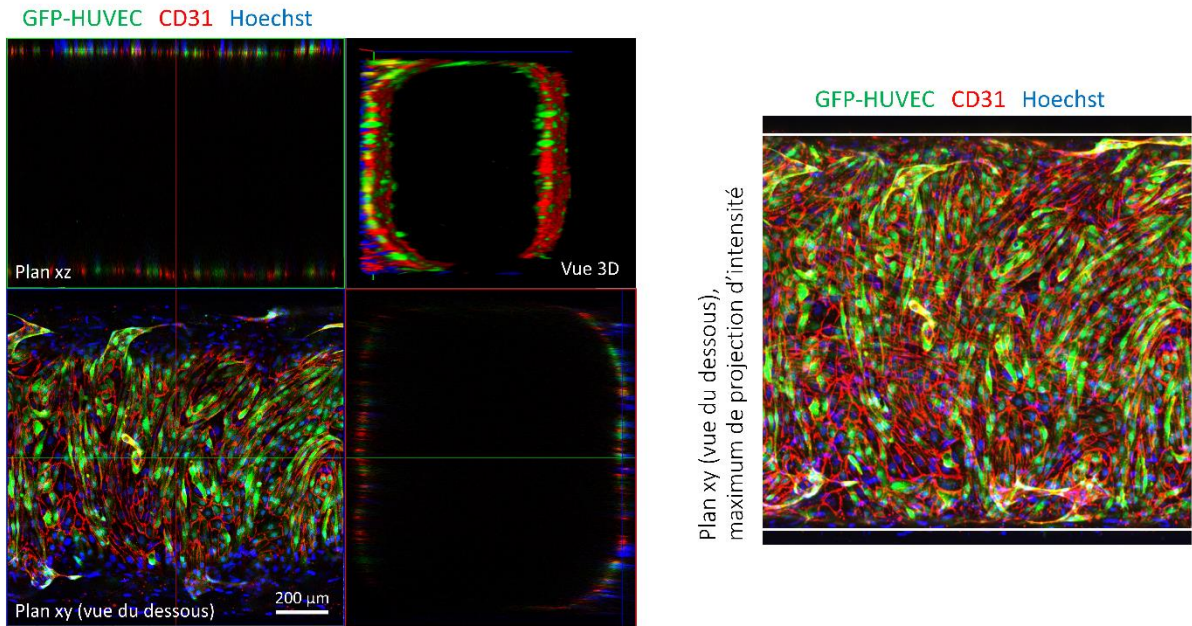


Figure 21 : Imagerie confocale d'une partie rectiligne du canal principal en serpentin près du piège (vue du dessous, vues orthogonale et vue 3D). Grâce au dépôt d'hydrogel sur les parois du canal en serpentin, les cellules incorporées dans l'hydrogel tapissent rapidement les parois du canal, créant ainsi un large vaisseau dans lequel le milieu de culture s'écoule librement pour une perfusion continue, se ramifiant au niveau du piège en vaisseaux plus petits (réseau GFP-HUVEC puis capillaires du BVO).

3.6 Organoïdes de cœur

Notons que nous avons également testé cette même méthode pour perfuser des organoïdes de cœur pré-vascularisés, en collaboration avec l'IMBA. Ces organoïdes de cœur ont été générés par Sahra Tasdelen, à Vienne, que nous remercions. La génération de ces cardioïdes a fait l'objet d'une publication récente, que le lecteur curieux est invité à parcourir⁴⁰. Les résultats préliminaires (n = 1) obtenus avec ces organoïdes-sur-puce ressemblent à ceux présentés ci-dessus avec les BVO. Afin de vérifier la compatibilité de l'hydrogel de fibrine avec la culture de ces cardioïdes, nous avons cultivé ces derniers incorporés dans l'hydrogel dans des plaques à puits. Après seulement 48 h de culture, des bourgeonnements endothéliaux émergent des organoïdes, démontrant leur habilité à croître dans le gel de fibrine (Fig. 22a). Cultivés dans les puces microfluidiques comme décrit dans les sections ci-dessus, un réseau endothélial GFP-HUVEC s'est organisé autour du cardioïde après quelques jours de mise en culture (Fig. 22b).

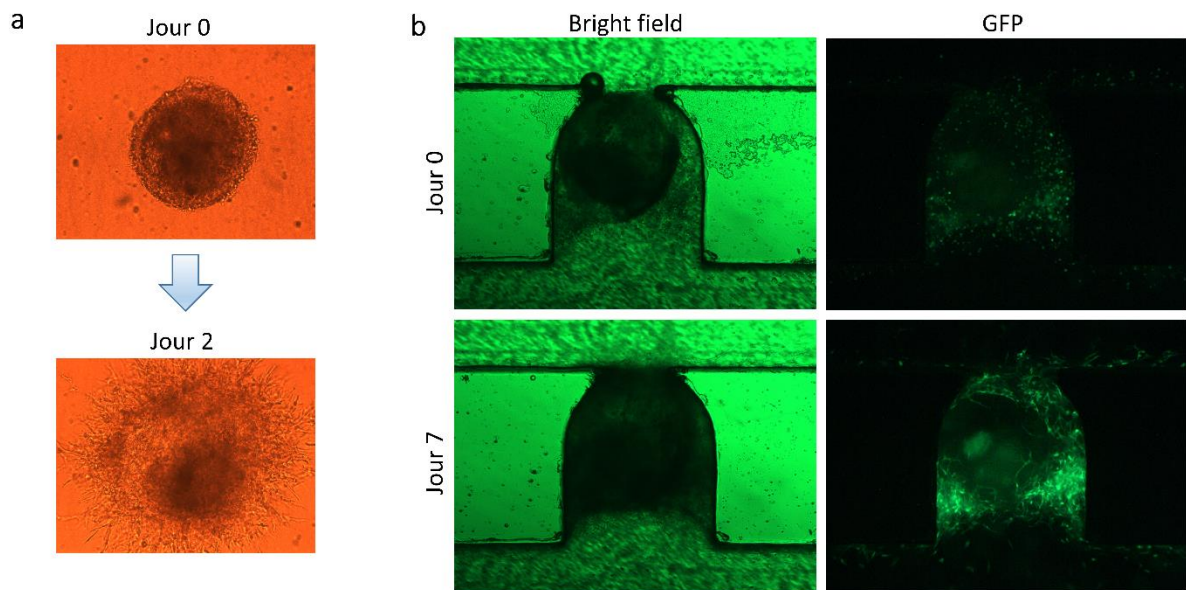


Figure 22 : **a.** Bourgeonnements endothéliaux en périphérie du cardioïde au 2^{ème} jour de culture en hydrogel en condition statique (plaque 96 puits), **b.** Développement du réseau endothélial GFP-HUVEC autour du cardioïde.

Après immunomarquage, des vaisseaux ont bien été identifiés au sein du cardioïde (Fig. 23), et ceux-ci semblent se connecter au réseau HUVEC (Fig. 23 encadré). Le marquage GFP visible au cœur de l'organoïde est un marquage des cardiomyocytes fait au moment de la génération des organoïdes. Ces résultats prometteurs appuient la souplesse de notre approche et son potentiel pour vasculariser une large gamme de tissus biologiques.

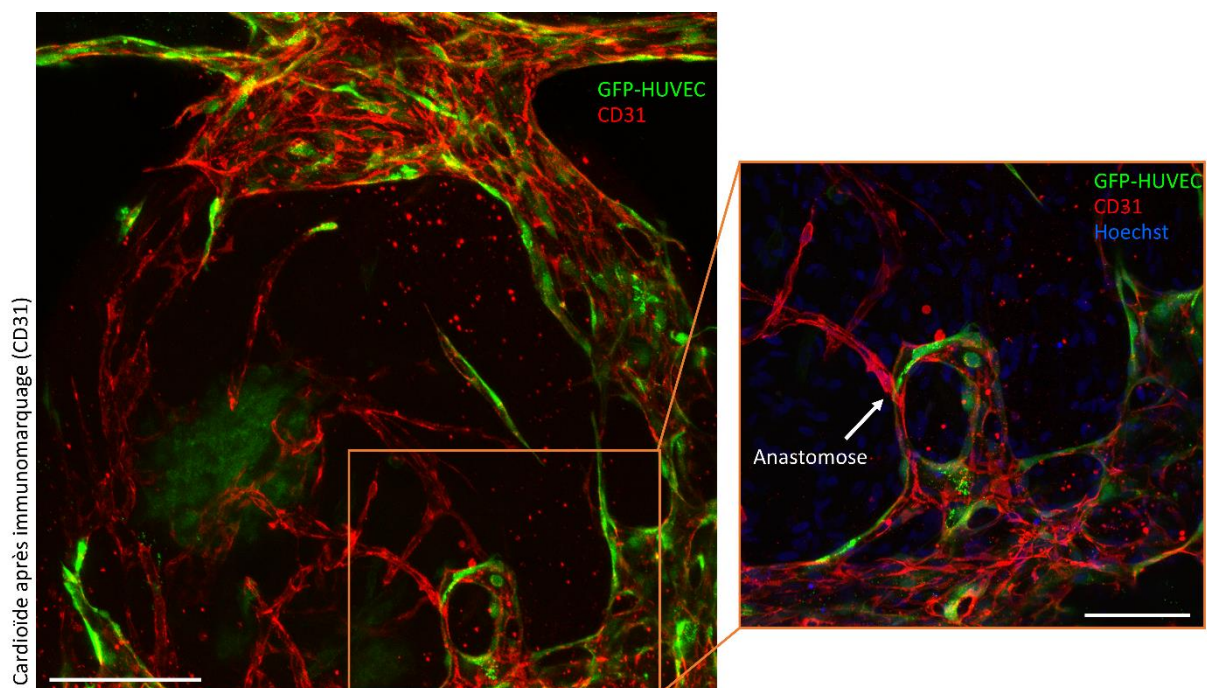


Figure 23 : Images représentatives des cardioïdes-sur-puce vascularisés au 7^{ème} jour de culture, après immunomarquage (expression de CD31 (rouge) et marqueur nucléaire Hoechst (bleu)). L'endothélium des cardioïdes correspondant aux vaisseaux CD31⁺GFP⁻ est visible au centre. Une zone où les vaisseaux des cardioïdes (CD31⁺GFP⁻) semblent fusionner avec le réseau endothélial HUVEC (CD31⁺GFP⁺) sont indiquées par une flèche blanche (encadré). Barres d'échelles, 200 μ m et 100 μ m (encadré).

4 Conclusion

Dans ce Chapitre, nous avons présenté une plateforme microfluidique innovante qui fournit des solutions simples et robustes pour former des organoïdes-sur-puce vascularisés, avec un contrôle précis des écoulements générés pendant la perfusion à court et à long terme. Grâce à cette nouvelle approche, nous pouvons contrecarrer les problèmes souvent rencontrés par les utilisateurs d'organes-sur-puce, tels que les nombreuses opérations manuelles, le manque d'automatisation dans la localisation des sphéroïdes ou des organoïdes et l'injection délicate des hydrogels (voir Chapitre 1). Le dispositif a été fabriqué en COC, un matériau adapté aux procédés d'industrialisation, et qui évite les complications des systèmes en PDMS, notamment l'absorption de petites molécules particulièrement problématique pour les applications biomédicales. De plus, dans la plupart des études, l'écoulement est généré par différence de pression hydrostatique entre les différents réservoirs placés aux entrées et aux sorties des puces microfluidiques. Bien que cette méthode présente l'avantage de la simplicité, la différence de pression hydrostatique optimale ne peut être maintenue pendant une longue période, avec pour conséquence que le milieu de culture doit être changé régulièrement^{9,41,42}. Ceci peut être évité en utilisant des plateformes de perfusion à bascule^{17,43}, mais cela n'est pas représentatif des flux *in vivo*. Dans notre étude, ce problème a été résolu grâce à l'utilisation d'un pousse-seringue. En utilisant des seringues de 20 ml, la perfusion microfluidique peut être maintenue pendant deux semaines à un débit de 1 $\mu\text{l}/\text{min}$ sans déconnecter les seringues du circuit. Il convient de noter qu'en utilisant un pousse-seringue à 10 voies, comme cela a été fait dans cette étude, l'écoulement peut être généré dans 10 circuits microfluidiques indépendants en parallèle. Enfin, l'organoïde et l'hydrogel ont été placés de façon passive au sein d'un piège hydrodynamique, dans lequel les cellules ont été soumises à une contrainte de cisaillement minimale. Ces pièges peuvent être conçus en série, permettant ainsi de placer plusieurs organoïdes vascularisés et interconnectés par des réseaux endothéliaux.

L'injection des cellules et de l'hydrogel, ainsi que la perfusion à long terme des organoïdes avec le milieu de culture, ont été réalisés à travers une seule entrée fluide. Cette méthode automatisée de manipulation des fluides offre la simplicité requise pour disséminer les dispositifs microfluidiques dans les industries ou les hôpitaux. Enfin, la plateforme microfluidique présentée offre une certaine robustesse grâce à une technique d'encapsulation innovante, qui repose sur des effets hydrodynamiques et capillaires largement indépendants de la pression de travail. Alors que l'injection du gel est souvent une étape délicate dans les conceptions de puces conventionnelles décrites dans la littérature scientifique, le processus utilisé ici est hautement reproductible et facile à réaliser. Les étapes d'injection peuvent être réalisées en quelques secondes, ce qui permet d'effectuer toutes les opérations à température ambiante. En résumé, cette nouvelle plateforme d'organe-sur-puce est très robuste et facile d'utilisation, ce qui permet de surmonter certains des principaux obstacles à l'industrialisation des organes-sur-puce.

Notre dispositif microfluidique permet la vascularisation et la perfusion d'un tissu biologique tridimensionnel. La formation de réseaux endothéliaux s'est avérée hautement reproductible. Fait important, nous avons pu générer des flux physiologiques dans ces réseaux, avec des vitesses d'écoulement dans les vaisseaux observées allant de $\bar{v} = 100 \mu\text{m}/\text{s}$ à $v = 7500 \mu\text{m}/\text{s}$ et des taux de cisaillement allant de $\dot{\gamma}_w = 25 \text{ s}^{-1}$ à 1500 s^{-1} . Ainsi, les vitesses d'écoulement du sang et les taux de cisaillement observés dans les capillaires humains, allant de 500 à $1500 \mu\text{m}/\text{s}$ et de 100 à 500 s^{-1} , respectivement, peuvent être facilement atteints en utilisant notre plateforme microfluidique. Cela contraste avec ce qui a été rapporté dans des précédentes études, où les dispositifs contrôlés par pression hydrostatique conduisent souvent à des débits plus faibles²³. Enfin, le dépôt de l'hydrogel sur les parois des microcanaux, conditionné par l'effet Landau-Levich-Bretherton, offre une méthode robuste d'endothélialisation du canal de perfusion. Il n'est donc pas nécessaire de préalablement « coater » les canaux et d'incliner les puces pour faire adhérer les cellules aux parois, comme cela est souvent rapporté^{44,45}.

La configuration de la puce décrite ici a permis de réaliser une anastomose entre un réseau endothélial constitué par des cellules HUVEC, et l'endothélium des organoïdes de vaisseaux sanguins. Dans cette étude, nous avons réalisé la perfusion intravasculaire de ces organoïdes. Notre plateforme pourrait ainsi permettre l'étude de nombreux sujets, tels que l'augmentation de la durée de vie des organoïdes grâce à la vascularisation, la circulation et le devenir des cellules immunitaires dans les organoïdes, l'exposition à des médicaments, à des acides nucléiques ou à un stress métabolique. Le dispositif que nous avons développé offre également la flexibilité nécessaire pour vasculariser d'autres types d'organoïdes pré-endothélialisés, de sphéroïdes, de tumoroïdes ou d'autres tissus humains.

Annexe A

Scripts ImageJ pour les traitements d'images.

1. Code de soustraction d'images (afin de ne garder que les objets en mouvement d'une image à l'autre) :

```
input=getDirectory("Choose a Directory ");
output=getDirectory("Choose a Directory ");
setBatchMode(true);
requires("1.33s")
list=getFileList(input);
for (i=0; i<list.length-1; i++) {
print (i);
open(input + list[i]);
open (input + list[i+1]);
imageCalculator("Subtract create", list[i],list[i+1]);
run("8-bit");
selectWindow(list[i]);
close();
selectWindow(list[i+1]);
close();
saveAs ("Tif", output + list [i]);
close();
}
```

2. Code de la coloration des images binarisées en fonction du temps :

```
input=getDirectory("Choose a Directory ");
outputsum=getDirectory("Choose a Directory ");
input=getDirectory("Choose a Directory ");

requires("1.33s");
//dir = getDirectory("Choose a Directory ");
setBatchMode(true);

list=getFileList(input);
totalfiles=list.length;
```

```

run("Fire");
getLut(rA, gA, bA);
close();

nrA = newArray(256);
ngA = newArray(256);
nbA = newArray(256);

relative=255/totalfiles;

repeats= floor(totalfiles/100)
write (repeats + "repeats")
j=0;
print(j);
open(input + list[j]);

idold=getImageID;
//run("Invert");
nrA[255] = round(rA[j * relative] );
ngA[255] = round(gA[j * relative] );
nbA[255] = round(bA[j * relative] );
setLut(nrA,ngA,nbA);

saveAs ("png", outputsum + list [j]);
run("RGB Color");

for (i=1;i<repeats+1;i++){
  for (j = 100*(i-1)+1; j < i*100+1; j++) {
    print(j);
    open(input + list[j]);
    idnew = getImageID;
    run("8-bit");
    // run("Invert");
    nrA[255] = round(rA[j * relative] );
    ngA[255] = round(gA[j * relative] );
    nbA[255] = round(bA[j * relative] );
    setLut(nrA,ngA,nbA);
    run("RGB Color");
    imageCalculator("Add create", idold, idnew);
    selectImage(idold);
    close();
    idold=getImageID;
    saveAs ("png", outputsum + list [j]);

    selectImage(idnew);
    close();
  }
}
for (j = (repeats)*100; j < totalfiles; j++) {
  print(j);
  open(input + list[j]);
  idnew = getImageID;
  run("8-bit");
  // run("Invert");
  nrA[255] = round(rA[j * relative] );
  ngA[255] = round(gA[j * relative] );
  nbA[255] = round(bA[j * relative] );
  setLut(nrA,ngA,nbA);
  run("RGB Color");
  imageCalculator("Add create", idold, idnew);
  selectImage(idold);

```

```

close();
idold=getImageID;
saveAs ("png", outputsum + list [j]);

selectImage(idnew);
close();
}

```

Bibliographie

1. Quintard, C. *et al.* An automated microfluidic platform integrating functional vascularized organoids-on-chip. 2021.12.29.474327 <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2021.12.29.474327v1> (2021) doi:10.1101/2021.12.29.474327.
2. Bartfeld, S. Realizing the potential of organoids—an interview with Hans Clevers. *J. Mol. Med. Berl. Ger.* **99**, 443–447 (2021).
3. Matthias Lutolf, interviewed by Peter Loskill (Vice-Chair of EUROoC, the European-Organ-on-Chip-Society). *Stem Cell Rep.* **16**, 2044–2046 (2021).
4. Auger, F. A., Gibot, L. & Lacroix, D. The Pivotal Role of Vascularization in Tissue Engineering. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **15**, 177–200 (2013).
5. van Duinen, V., Trietsch, S. J., Joore, J., Vulto, P. & Hankemeier, T. Microfluidic 3D cell culture: from tools to tissue models. *Curr. Opin. Biotechnol.* **35**, 118–126 (2015).
6. Liu, H. *et al.* Advances in Hydrogels in Organoids and Organs-on-a-Chip. *Adv. Mater.* **31**, 1902042 (2019).
7. Whisler, J. A., Chen, M. B. & Kamm, R. D. Control of Perfusable Microvascular Network Morphology Using a Multiculture Microfluidic System. *Tissue Eng. Part C Methods* **20**, 543–552 (2012).
8. Kim, S., Lee, H., Chung, M. & Jeon, N. L. Engineering of functional, perfusable 3D microvascular networks on a chip. *Lab. Chip* **13**, 1489–1500 (2013).
9. Alonzo, L. F., Moya, M. L., Shirure, V. S. & George, S. C. Microfluidic device to control interstitial flow-mediated homotypic and heterotypic cellular communication. *Lab. Chip* **15**, 3521–3529 (2015).
10. Nashimoto, Y. *et al.* Vascularized cancer on a chip: The effect of perfusion on growth and drug delivery of tumor spheroid. *Biomaterials* **229**, 119547 (2020).
11. Paek, J. *et al.* Microphysiological Engineering of Self-Assembled and Perfusable Microvascular Beds for the Production of Vascularized Three-Dimensional Human Microtissues. *ACS Nano* **13**, 7627–7643 (2019).
12. Shirure, V. S. *et al.* Tumor-on-a-chip platform to investigate progression and drug sensitivity in cell lines and patient-derived organoids. *Lab. Chip* **18**, 3687–3702 (2018).
13. Sobrino, A. *et al.* 3D microtumors in vitro supported by perfused vascular networks. *Sci. Rep.* **6**, 1–11 (2016).
14. Rambøl, M. H., Han, E. & Niklason, L. E. Microvessel Network Formation and Interactions with Pancreatic Islets in Three-Dimensional Chip Cultures. *Tissue Eng. Part A* (2019) doi:10.1089/ten.tea.2019.0186.
15. Homan, K. A. *et al.* Flow-enhanced vascularization and maturation of kidney organoids in vitro. *Nat. Methods* **16**, 255–262 (2019).
16. Cakir, B. *et al.* Engineering of human brain organoids with a functional vascular-like system. *Nat. Methods* **16**, 1169–1175 (2019).
17. van Duinen, V. *et al.* Perfused 3D angiogenic sprouting in a high-throughput in vitro platform. *Angiogenesis* **22**, 157–165 (2019).
18. Campisi, M. *et al.* 3D self-organized microvascular model of the human blood-brain barrier with endothelial cells, pericytes and astrocytes. *Biomaterials* **180**, 117–129 (2018).
19. Sano, E. *et al.* Engineering of vascularized 3D cell constructs to model cellular interactions through a vascular network. *Biomicrofluidics* **12**, 042204 (2018).
20. Haase, K., Gillrie, M. R., Hajal, C. & Kamm, R. D. Pericytes Contribute to Dysfunction in a Human 3D Model of Placental Microvasculature through VEGF-Ang-Tie2 Signaling. *Adv. Sci.* **6**, 1900878 (2019).
21. Nashimoto, Y. *et al.* Integrating perfusable vascular networks with a three-dimensional tissue in a microfluidic device. *Integr. Biol.* **9**, 506–518 (2017).
22. van Duinen, V. *et al.* 96 perfusable blood vessels to study vascular permeability in vitro. *Sci. Rep.* **7**, 1–11 (2017).
23. Phan, D. T. T. *et al.* A vascularized and perfused organ-on-a-chip platform for large-scale drug screening applications. *Lab. Chip* **17**, 511–520 (2017).

24. Wang, X., Sun, Q. & Pei, J. Microfluidic-Based 3D Engineered Microvascular Networks and Their Applications in Vascularized Microtumor Models. *Micromachines* **9**, 493 (2018).
25. Zhang, B., Korolj, A., Lai, B. F. L. & Radisic, M. Advances in organ-on-a-chip engineering. *Nat. Rev. Mater.* **3**, 257–278 (2018).
26. Garreta, E. *et al.* Rethinking organoid technology through bioengineering. *Nat. Mater.* 1–11 (2020) doi:10.1038/s41563-020-00804-4.
27. Wimmer, R. A. *et al.* Human blood vessel organoids as a model of diabetic vasculopathy. *Nature* **565**, 505–510 (2019).
28. Wimmer, R. A., Leopoldi, A., Aichinger, M., Kerjaschki, D. & Penninger, J. M. Generation of blood vessel organoids from human pluripotent stem cells. *Nat. Protoc.* **14**, 3082–3100 (2019).
29. Carpentier, G., Martinelli, M., Courty, J. & Gascone, I. Angiogenesis analyzer for ImageJ. 4th ImageJ User and Developer Conference proceedings. (pp. 198-201). <https://imagej.nih.gov/ij/macros/toolsets/Angiogenesis%20Analyzer.txt> (2012).
30. Jeon, J. S., Chung, S., Kamm, R. D. & Charest, J. L. Hot embossing for fabrication of a microfluidic 3D cell culture platform. *Biomed. Microdevices* **13**, 325–333 (2011).
31. Tan, W.-H. & Takeuchi, S. A trap-and-release integrated microfluidic system for dynamic microarray applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**, 1146–1151 (2007).
32. Tan, W.-H. & Takeuchi, S. Dynamic microarray system with gentle retrieval mechanism for cell-encapsulating hydrogel beads. *Lab Chip* **8**, 259–266 (2008).
33. Zbinden, A. *et al.* Non-invasive marker-independent high content analysis of a microphysiological human pancreas-on-a-chip model. *Matrix Biol.* **85–86**, 205–220 (2020).
34. Quintard, C., Achard, J.-L. & Fouillet, Y. Method for achieving microfluidic perfusion of a spheroid and device suitable for implementing said method. (2021).
35. Ajaev, V. S. & Homsy, G. M. Modeling shapes and dynamics of confined bubbles. *Annu Rev Fluid Mech* **38**, 277–307 (2006).
36. Hathcock James J. Flow Effects on Coagulation and Thrombosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **26**, 1729–1737 (2006).
37. Mansour, A. A. *et al.* An in vivo model of functional and vascularized human brain organoids. *Nat. Biotechnol.* **36**, 432–441 (2018).
38. Takebe, T. *et al.* Vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant. *Nature* **499**, 481–484 (2013).
39. van den Berg, C. W. *et al.* Renal Subcapsular Transplantation of PSC-Derived Kidney Organoids Induces Neovascularization and Significant Glomerular and Tubular Maturation In Vivo. *Stem Cell Rep.* **10**, 751–765 (2018).
40. Hofbauer, P. *et al.* Cardioids reveal self-organizing principles of human cardiogenesis. *Cell* **184**, 3299–3317.e22 (2021).
41. Sudo, R. *et al.* Transport-mediated angiogenesis in 3D epithelial coculture. *FASEB J.* **23**, 2155–2164 (2009).
42. Song, J. W., Bazou, D. & Munn, L. L. Anastomosis of endothelial sprouts forms new vessels in a tissue analogue of angiogenesis. *Integr. Biol.* **4**, 857–862 (2012).
43. Nguyen, D.-H. T. *et al.* Biomimetic model to reconstitute angiogenic sprouting morphogenesis in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**, 6712–6717 (2013).
44. Oh, S. *et al.* “Open-top” microfluidic device for in vitro three-dimensional capillary beds. *Lab. Chip* **17**, 3405–3414 (2017).
45. Vickerman, V. & Kamm, R. D. Mechanism of a flow-gated angiogenesis switch: early signaling events at cell–matrix and cell–cell junctions. *Integr. Biol.* **4**, 863–874 (2012).

Chapitre 4 : Perfectionnement de l'architecture en serpentin par un système de vannes pour la perfusion d'îlots pancréatiques

Chapitre 4

Chapitre 4 : Perfectionnement de l'architecture en serpentín par un système de vannes pour la perfusion d'îlots pancréatiques	125
1 Introduction.....	127
1.1 Idée directrice.....	127
1.2 Contexte de l'étude	127
2 Matériel et méthodes.....	129
2.1 Ilots pancréatiques humains	129
2.2 Test de sécrétion d'insuline stimulée par le glucose (test GSIS)	130
2.3 Principe de piégeage et injection des îlots de Langerhans	131
2.4 Simulation numérique de la dynamique de l'écoulement	131
2.5 Quantification de l'insuline	132
2.6 Viabilité des îlots	132
2.7 Imagerie.....	132
2.8 Conception et fabrication des puces.....	132
2.9 Modélisation de la déformation hyperélastique de la membrane	134
3 Résultats	135
3.1 Modélisation de la membrane hyperélastique dans une puce microfluidique dédiée	135
3.2 Validation des vannes pour la puce microfluidique de perfusion d'îlots de Langerhans....	138
3.3 Piégeage des îlots et taux de cisaillement associés	140
3.4 Validation du protocole fluidique et perfusion de l'îlot	141
4 Conclusion	147
Annexe A	148
Annexe B.....	154
Bibliographie.....	156

Ce chapitre est largement adapté de l'article « Microfluidic device integrating a network of hyper-elastic vannes for automated glucose stimulation and insulin secretion collection from a single pancreatic islet », Quintard et al., Biosensors and Bioelectronics 2022¹, disponible en Annexe 2 en fin de manuscrit.

1 Introduction

1.1 Idée directrice

Dans le chapitre précédent, nous avons vu comment l'architecture microfluidique choisie nous a permis d'assurer la perfusion de sphéroïdes et d'organoïdes préalablement piégés dans le bipasse associé au chemin B. Cependant, le contrôle précis des écoulements dans les chemins A et B de façon indépendante est délicat. Seul l'ajustement des paramètres géométriques évoqués au Chapitre 2 peut permettre d'aiguiller le flux préférentiellement vers la boucle (chemin A) ou le bipasse (chemin B). Or, il peut être intéressant d'étudier les sécrétions du sphéroïde étudié ; dans ce cas, on souhaite s'assurer que l'écoulement se fait uniquement par le chemin B pour une bonne sensibilité (au contraire, si l'écoulement se fait également par la boucle du chemin A, les sécrétions récoltées se retrouveront largement diluées).

Ainsi dans ce chapitre, on se propose d'améliorer l'architecture précédemment présentée en incorporant un réseau de vannes hyperélastiques permettant d'aiguiller précisément les flux dans le circuit microfluidique. Pour démontrer l'intérêt de notre plateforme microfluidique, nous avons travaillé avec des îlots pancréatiques (aussi appelés îlots de Langerhans) provenant de donneurs cadavériques, qui sont des amas de cellules tridimensionnelles sécréteurs d'insuline, hormone favorisant l'absorption du glucose présent dans le sang par les cellules adipeuses, les cellules du foie et celles des muscles squelettiques. L'étude des îlots de Langerhans est primordiale pour mieux comprendre et soigner les diabètes sucrés, maladies de la sécrétion d'insuline. Il est classique, pour examiner la fonctionnalité des îlots pancréatiques, de les soumettre à un test de stimulation en glucose (test GSIS pour Glucose Stimulated Insulin Secretion en anglais). Un îlot fonctionnel répond à une stimulation en glucose en sécrétant davantage d'insuline. Ces tests sont généralement réalisés dans des plaques à puits de façon statique et nécessitant de nombreuses opérations manuelles de pipetage. Dans ce Chapitre, on développera une approche microfluidique pour la réalisation de test GSIS automatisé sur un seul îlot pancréatique humain isolé.

1.2 Contexte de l'étude

Le développement de plateformes microfluidiques permettant la manipulation de divers tissus biologiques et le contrôle des stimuli pour l'étude de processus biologiques complexes suscite un intérêt croissant². Récemment, plusieurs études ont montré l'intérêt des dispositifs microfluidiques pour des applications aussi diverses que l'étude de la cardiotoxicité induite par les médicaments³, le test de médicaments anticancéreux⁴ ou la détection de pathogènes⁵. Ces études prometteuses soulignent les avantages uniques de la microfluidique tels que sa robustesse, ses capacités de parallélisation, ses faibles coûts de fabrication et de maintenance, et surtout sa capacité à contrôler précisément de petits volumes de liquide adaptés à l'échelle biologique. Ces dispositifs microfluidiques permettent enfin de créer un microenvironnement

dynamique et contrôlé autour des cellules pour mieux reproduire les conditions physiologiques que l'on observe dans le corps humain.

En particulier, l'application de la microfluidique aux dispositifs de perfusion d'îlots pancréatiques constitue une approche prometteuse pour les raisons mentionnées ci-dessus⁶⁻¹⁰. La construction d'outils analytiques *in vitro* est cruciale pour modéliser la complexité de la physiologie et de la physiopathologie des îlots pancréatiques pour une meilleure compréhension de leur biologie fondamentale ainsi que pour le criblage de nouveaux médicaments. Alors que les systèmes de perfusion les plus courants nécessitent le regroupement de plusieurs îlots pour obtenir des concentrations d'insuline quantifiables, il est important de minimiser le nombre d'îlots requis pour les expériences utilisant des plateformes microfluidiques étant donné la rareté de ces tissus biologiques provenant de donneurs. Plusieurs groupes ont ainsi développé des dispositifs microfluidiques avec une sensibilité suffisante pour quantifier les sécrétions d'un seul îlot¹¹⁻¹⁵. Malgré cela, l'adoption des plateformes microfluidiques dans l'industrie et les hôpitaux a été relativement lente en raison notamment d'une trop grande complexité des systèmes qui doivent être mis en œuvre par des utilisateurs expérimentés et habitués des dispositifs microfluidiques^{16,17}.

Afin d'améliorer l'automatisation et la parallélisation des dispositifs microfluidiques, de nombreux efforts ont été déployés pour développer des architectures microfluidiques intégrant un piégeage hydrodynamique. Certains systèmes reposent ainsi sur des microcanaux parallèles agissant comme un filtre¹⁸, d'autres sur la sédimentation d'objets biologiques 3D dans des micropuits¹⁹, d'autres encore font intervenir des flux micro-rotationnels²⁰ ou des méthodes de piégeage optothermiques²¹. La méthode de piégeage hydrodynamique dans l'architecture en serpentin, que nous avons choisie et largement décrite dans les précédents chapitres, a déjà été utilisée pour la perfusion d'îlots pancréatiques^{22,23} et de sphéroïdes cancéreux²⁴. De façon remarquable, Zbinden et al.²⁵ ont intégré une telle plateforme microfluidique avec un système à microspectroscopie Raman pour suivre la cinétique de sécrétion d'insuline de pseudo-îlots. Cependant, ces dispositifs de piégeage ne sont généralement pas couplés à des systèmes de contrôle des écoulements des liquides pour permettre la réalisation d'essais biologiques complexes sur puce. En particulier, dans cette architecture en serpentin avec des biphases, le flux est principalement redirigé vers la boucle de contournement une fois que les sites de piégeage sont occupés. Il est donc crucial de reconfigurer le circuit microfluidique pour forcer l'écoulement à travers les sites de piégeage où se trouvent les îlots de Langerhans, afin de collecter les sécrétions avec une grande sensibilité. La microfluidique à base de vannes peut être considérée comme la réponse à ce défi^{26,27}, mais les petites déformations qui peuvent être obtenues avec les vannes classiquement obtenues grâce à l'actionnement d'une membrane en PDMS sont mieux adaptées aux dispositifs à cellule unique²⁸. Lorsque l'on travaille avec de grands agrégats cellulaires en 3D, tels que les îlots pancréatiques (qui font de 50 μm à 500 μm de diamètre), les propriétés de déformation élastique du PDMS ne sont plus suffisantes. Cependant, réduire localement les dimensions des microcanaux fluidiques pour intégrer des vannes n'est pas une

option, non seulement à cause de la fragilité des îlots pancréatiques qui ne peuvent être déformés, mais aussi parce que cela conduirait à des pertes de charge excessives, compromettant le fonctionnement du piège. Récemment, de nouveaux types de matériaux qualifiés d'hyperélastiques ont été utilisés pour la fabrication de robots flexibles²⁹. L'un de ces matériaux est l'Ecoflex 00-50, qui présente un taux d'élongation proche de 1000%, permettant l'intégration de vannes à l'intérieur des microcanaux fluidiques où peuvent circuler des tissus biologiques de plusieurs centaines de micromètres.

Nous avons développé une plateforme microfluidique compatible avec la taille des îlots pancréatiques et dotée d'un circuit fluide permettant des essais biologiques complexes. Un îlot pancréatique humain unique peut ainsi être dirigé le long du chemin fluide de moindre résistance vers une zone de piégeage. La fonctionnalité de l'îlot pancréatique dans la puce a été mesurée par un test de stimulation au glucose (test GSIS pour Glucose Stimulated Insulin Secretion en anglais). La stimulation au glucose et la récolte de l'insuline sécrétée ont été réalisées de manière automatisée par l'activation d'un réseau de vannes à l'intérieur de la puce.

2 Matériel et méthodes

2.1 Îlots pancréatiques humains

Deux sources d'îlots pancréatiques ont été utilisées dans cette étude.

Des microtissus d'îlots pancréatiques en 3D ont été achetés chez InSphero (Schlieren, Suisse). À leur arrivée dans des plaques GravityTRAP™ 96 puits, les microtissus ont été maintenus dans un milieu d'entretien pour îlots humains (InSphero) avant utilisation (1 à 3 jours). Ces îlots sont issus d'un donneur de 63 ans et de sexe féminin, qui sera dans la suite dénommé « Donneur 1 ».

D'autres îlots pancréatiques humains ont été fournis par le Laboratoire de thérapie cellulaire du diabète, Institut de médecine régénérative et des biothérapies, Hôpital St Eloi, Montpellier. Les îlots ont été isolés à partir du pancréas de donneurs en état de mort cérébrale selon une procédure qui a été approuvée par l'Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé (ANSM) conformément à la loi française de bioéthique (loi n° 2004-800 du 6 août 2004, modifiée par la loi n° 2011-814 du 7 juillet 2011). Ces procédures ont été réalisées avec l'approbation des autorités réglementaires compétentes. Les îlots ont été cultivés dans le milieu CMRL 1066, 1g/l Glucose (Gibco, réf.041-96907A) complété par 10% FBS, 10% Glutamax 100X (Gibco, réf.35050.038), 10mM Hepes (Gibco, réf.15630-057), 100 mg.Ul/ml Pénicilline, 100 µg/ml streptomycine (Gibco, réf.15140-122), dans une atmosphère humidifiée à 5% de CO₂ à 37°C. Viabilité des cellules après isolement : 80-90%. Ces îlots sont issus d'un donneur de 60 ans et de sexe masculin, qui sera dans la suite dénommé « Donneur 2 ». Les îlots dont le

diamètre est supérieur à la constriction de 200 μm et inférieur à la taille et à la largeur du canal de 400 μm ont été sélectionnés au préalable pour toutes les expériences.

2.2 Test de sécrétion d'insuline stimulée par le glucose (test GSIS)

Contrôle statique

Des tests GSIS conventionnels (statique, en puits) ont été réalisés afin de comparer les résultats obtenus en puce avec ceux obtenus avec des méthodes conventionnelles (Fig. 1). Les îlots ont d'abord été placés dans une plaque 96 puits (1 îlot par puits), et incubés à 37°C, 5% CO₂ pendant 1 heure dans 150 μl de tampon KREBS 1% BSA, 2,8 mM de glucose (phase de pré-incubation). Ensuite, les îlots ont été incubés pendant 1 heure avec une solution de glucose 2,8 mM (solution faiblement concentrée en glucose, LGS pour Low Glucose Solution en anglais) et pendant 1 heure avec une solution de glucose 16,7 mM (solution fortement concentrée en glucose, HGS pour High Glucose Solution en anglais). Après chaque étape d'incubation, les surnageants ont été recueillis et conservés à -80 °C. La concentration d'insuline dans chaque surnageant collecté a été mesurée en duplicat à l'aide du test ELISA de chimioluminescence de l'insuline humaine STELLUX (ALPCO).

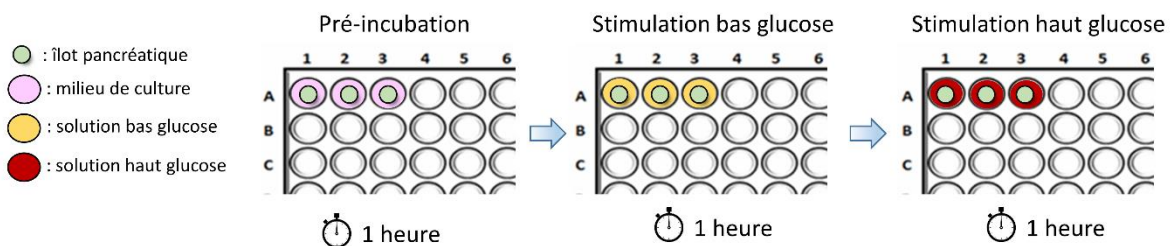


Figure 1 : Protocole d'un test GSIS classique en plaque à puits (ici sur 3 îlots pancréatiques).

Test GSIS sur puce

Le protocole classique de test GSIS précédemment décrit a été adapté à une configuration dynamique sur puce. L'architecture microfluidique choisie tire profit des capacités de contrôle des vannes pour diriger les différents réactifs. Brièvement, nous avons réalisé un protocole en plusieurs étapes en utilisant un réseau de vannes intégrées dans les canaux fluidiques. Tout d'abord, un îlot pancréatique humain a été injecté dans la puce par le canal principal en serpentin au débit de $Q = 100 \mu\text{L}/\text{min}$ (Fig. 2a, chemin vert). Les stimulations à faible (Fig. 2a, chemin jaune) et à fort (Fig. 2a, chemin rouge) taux de glucose ont ensuite été réalisées *via* différents chemins induits par l'actionnement du réseau de vannes pour diriger les flux de manière appropriée. Enfin, l'îlot a pu être retiré de la puce par le chemin principal en serpentin pour une stimulation au chlorure de potassium (KCl) et à l'éthanol acide afin de déterminer le contenu total en insuline de l'îlot. Ces phases ont duré une heure chacune. Toutes les opérations ont été effectuées dans une chambre thermostatique maintenue à 37°C. Un faible

débit de $Q=2,5 \mu\text{L}/\text{min}$ a été fixé pour toutes les phases de sécrétion entièrement automatisées. Le protocole détaillé est donné en Annexe A.

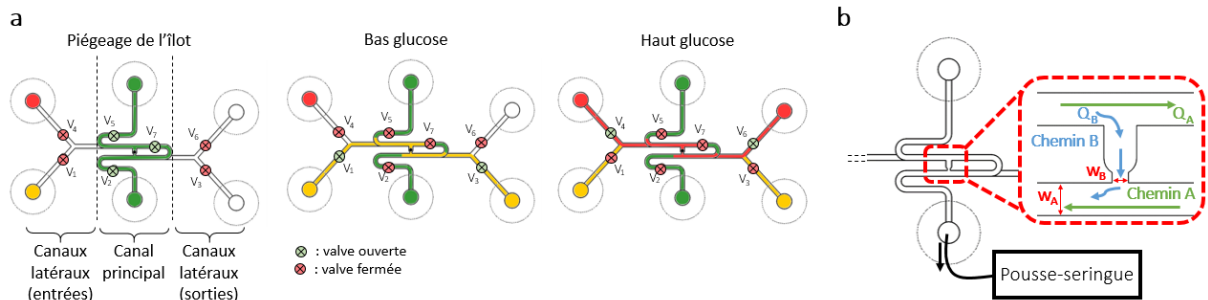


Figure 2 : Architecture microfluidique pour la réalisation du test GSIS. **a.** Schéma montrant une vue d'ensemble du protocole de test GSIS sur puce grâce à l'architecture microfluidique en serpentins couplée à un réseau de vannes pneumatiques, **b.** Vue de dessus du canal principal microfluidique. Un pousse-seringue est connecté à la sortie du canal pour introduire les différents réactifs.

2.3 Principe de piégeage et injection des îlots de Langerhans

Comme dans les chapitres précédents, le canal microfluidique est composé d'un canal principal en forme de serpentins court-circuité par un bipasse fonctionnant comme un piège à agrégats de cellules en 3D (Fig. 2b). Lorsque le piège est vide, l'îlot suit le chemin de moindre résistance hydrodynamique (chemin B), tandis qu'un îlot occupant le site du piège permet de contourner le raccourci et redirige le flux dans le canal en boucle (chemin A). Par conséquent, un îlot dans l'écoulement est piégé dans le bipasse à un débit de $Q = 100 \mu\text{L}/\text{min}$ où il est protégé du cisaillement. Afin de contrôler précisément le débit, l'injection des différents composants a été effectué à l'aide d'un pousse-seringue connecté à la sortie du canal, utilisé dans son mode de fonctionnement en aspiration (c'est-à-dire que le pousse-seringue tire le piston de la seringue). La stimulation des îlots de Langerhans et la collecte des sécrétions ont été réalisées *via* les canaux latéraux comprenant en entrée deux réservoirs pour les solutions faiblement et fortement concentrées en glucose, et connectés au pousse-seringue en sortie.

2.4 Simulation numérique de la dynamique de l'écoulement

L'écoulement des liquides dans le canal principal en serpentins a été modélisé avec COMSOL Multiphysics 5.4 (COMSOL, Burlington, MA, USA) en utilisant le module d'écoulement laminaire. La géométrie 3D a été importée depuis Solidworks, et un bloc solide a été placé dans le canal pour imiter la vanne forçant l'écoulement à travers le bipasse. La porosité de l'îlot a été omise et le module d'écoulement laminaire a été utilisé. Les propriétés de l'eau ont été attribuées au fluide s'écoulant à $Q = 2,5 \mu\text{L}/\text{min}$ dans le microcanal. Un maillage fin contrôlé par la physique a été utilisé pour une analyse stationnaire. La contrainte de cisaillement à la surface de l'îlot a été calculée pour un îlot de $300 \mu\text{m}$ de diamètre comme le produit de la viscosité dynamique et du taux de cisaillement $\tau = \mu\Delta\vec{v}$.

2.5 Quantification de l'insuline

Les concentrations d'insuline ont été mesurées à partir des surnageants de culture recueillis pendant le test GSIS, à l'aide du test ELISA STELLUX® Chemiluminescence Human Insulin (ALPCO) et du lecteur de plaques Tecan (Magellan). Chaque échantillon a été quantifié en duplicat afin de s'affranchir des erreurs de mesure. Un indice de stimulation (SI pour Stimulation Index en anglais) a été obtenu en calculant le rapport de la concentration en insuline issue de l'échantillon perfusé par la solution fortement concentrée en glucose, sur celle de l'échantillon perfusé par la solution faiblement concentrée en glucose : $SI = [HGS]/[LGS]$.

2.6 Viabilité des îlots

La viabilité des îlots a été déterminée après le test GSIS par une incubation de 15 minutes dans une solution de SYTO13 (concentration finale = 2,5 μ M) suivie d'une incubation de 5 minutes dans une solution d'iodure de propidium (IP) (concentration finale = 10 μ g/ml). Des z-stacks des îlots individuels ont été acquis au microscope confocal et projetés en 2D (projection d'intensité maximale) sur ImageJ/Fiji (National Institute of Health, New York, NY, USA) afin de mesurer la viabilité cellulaire. La quantification des noyaux des cellules vivantes marquées au SYTO13 et des noyaux des cellules mortes marquées à l'IP a permis d'évaluer la viabilité des îlots de Langerhans comme suit : $\text{viabilité (\%)} = (\text{nombre de noyaux verts}) / (\text{nombre de noyaux verts} + \text{nombre de noyaux rouges}) * 100$.

2.7 Imagerie

Les séquences vidéo de la perfusion de microbilles fluorescentes (Thermo Fisher Scientific Fluoro-Max Fluorescent Beads) ont été prises à 15 Hz sur un microscope inversé IX50 équipé d'une caméra CCD pilotée avec le logiciel Point Grey. Le traitement des images a été effectué à l'aide de ImageJ/Fiji.

2.8 Conception et fabrication des puces

Dans cette étude, nous avons utilisé des puces microfluidiques hybrides composées de plusieurs niveaux de COC et d'une membrane étirable.

Pour les tests GSIS sur puce, nous avons fabriqué la puce microfluidique avec un niveau fluide (F) et un niveau pneumatique (P) de part et d'autre de la membrane hyperélastique (structure « en sandwich », Fig. 3a). Ici, l'îlot pancréatique ainsi que les différents réactifs nécessaires aux tests GSIS s'écoulent dans les microcanaux du niveau fluide. Des canaux ont été micro-usinés dans le niveau pneumatique et positionnés à différents endroits du circuit microfluidique pour créer un réseau de vannes (Fig. 4a). Ces canaux pneumatiques ont été connectés à une source de pression pour souffler la membrane vers les canaux fluidiques. Ceci a permis d'établir un réseau de vannes afin d'ouvrir ou de fermer les canaux fluidiques à sept

endroits du circuit. Les vannes étaient considérées comme ouvertes lorsqu'aucune pression n'était appliquée (P_A), partiellement fermées lorsqu'une pression intermédiaire P_I était appliquée, et fermées lorsqu'une pression supérieure à la pression critique P_C nécessaire pour déformer la membrane de la hauteur h du canal fluide était appliquée (Fig. 4b). Il est important de noter que l'Ecoflex étant un matériau perméable aux gaz, les canaux pneumatiques ont été remplis de liquide (PBS) avant les expériences pour éviter la formation de bulles dans les canaux fluidiques lors de l'actionnement des vannes. Enfin, pour assurer l'étanchéité des vannes, les canaux fluidiques ont été usinés à l'aide d'une fraise ronde pour former des canaux hémicylindriques afin que la membrane puisse épouser parfaitement leur forme. Les canaux pneumatiques ont été usinés à une profondeur et une largeur de 200 μm . Ils ont été connectés au contrôleur de pression via des ports luer standard et la membrane a été percée avec une aiguille à ces endroits spécifiques pour permettre à l'air de s'écouler vers les microcanaux. Les canaux fluidiques, mesurant 400 μm (canal principal) ou 200 μm (canaux latéraux) de hauteur et 400 μm de largeur, ont alors été connectés au pousse-seringue *via* des ports luer également.

Pour caractériser le comportement hyperélastique de la membrane, des expériences ont été réalisées sur une puce fabriquée comme précédemment décrit, comprenant un ensemble de chambres élémentaires dont les volumes étaient contrôlables. Des chambres hémisphériques ont été micro-usinées sur le niveau P, ainsi que des micro-canaux communiquant avec les vannes et les chambres hémisphériques. Ce niveau a été placé face au niveau F recouvert par la membrane. Les microcanaux permettant la communication avec les chambres étirables et les entrées et sorties fluidiques, ont eux été micro-usinés sur le niveau F (Fig. 5).

Toutes les puces microfluidiques ont été conçues à l'aide du logiciel Solidworks, et possèdent des dimensions type carte de crédit (85,6 x 54 mm). Les canaux microfluidiques ont été directement usinés dans une plaque de copolymère d'oléfine cyclique (COC) (TOPAS, US) à l'aide d'un équipement de fraisage de précision DATRON M7HP (DATRON, GE).

La membrane hyperélastique a été réalisée par centrifugation d'Ecoflex 00-50 (Smooth on, US) sur un wafer de silicium à 3000 tours/minute pendant 6,5 secondes, ce qui permet d'obtenir une couche d'Ecoflex d'environ 150 μm d'épaisseur. Ce matériau silicone bi-composant résiste à des déformations plus importantes que le PDMS, présentant un module d'Young autour de 200 kPa et un rapport d'étirement maximal avant rupture de 980 %. La membrane est ensuite collée par plasma aux couches pneumatique et fluide selon un protocole adapté de l'assemblage COC - PDMS³⁰. Avant l'assemblage, les surfaces sont nettoyées à l'éthanol, rincées à l'eau et séchées. Les surfaces des niveaux pneumatiques et fluidiques ont été activées par plasma oxygène et silanisées par une immersion de 30 min dans une solution de 3-amino-propyl-triéthoxy-silane (APTES) à 2%. L'Ecoflex activé par plasma a alors été laminé sur le niveau pneumatique, avant d'être recouvert par le niveau fluide. Enfin, l'assemblage a été scellé sous presse pendant 15 minutes (Fig. 3).

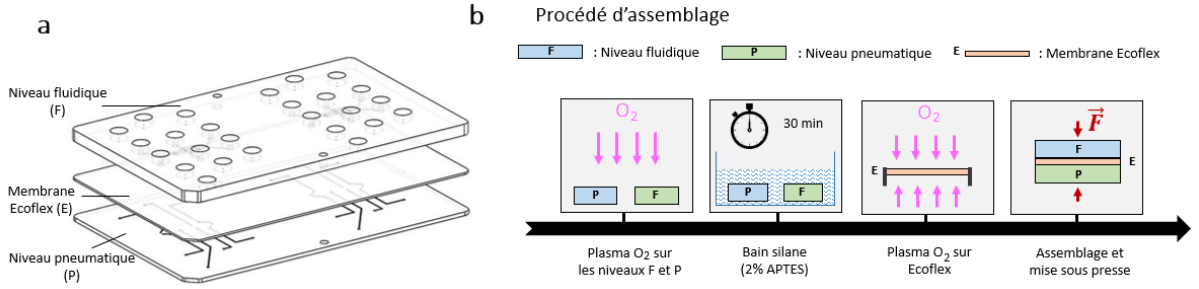


Figure 3 : Assemblage de la puce microfluidique. **a.** Vue éclatée en 3D de Solidworks de la puce microfluidique montrant les trois niveaux à assembler : le niveau fluïdique (F), le niveau pneumatique (P) et la membrane étirable Ecoflex (E) prise en sandwich entre les deux, **b.** Processus d'assemblage de la puce, étape par étape.

2.9 Modélisation de la déformation hyperélastique de la membrane

La relation contrainte-déformation utilisée ici pour décrire les caractéristiques de la membrane hyperélastique est celle dérivée du modèle de Yeoh³¹, une extension d'ordre supérieur de la loi de Hooke, et couramment utilisée pour décrire le comportement de matériaux élastiques incompressibles et non linéaires tels que l'Ecoflex. Pour évaluer la validité du modèle dans notre configuration et pour déterminer les niveaux de pression nécessaires pour activer la membrane jusqu'à ce qu'elle obstrue complètement les canaux fluidiques, des expériences ont été réalisées. Dans ces études, le mode de déformation étant équibiaxial, les allongements λ_1 , λ_2 et λ_3 dans les directions principales de l'espace ont été simplifiés de la manière suivante : $\lambda_1 = \lambda_2 = \lambda$ et $\lambda_3 = \lambda^{-2}$. L'expression de la contrainte mécanique est ainsi donnée par³² :

$$\sigma_Y = 2 \left(\lambda^2 - \frac{1}{\lambda^4} \right) \left(c_1 + 2 c_2 \left(2\lambda^2 + \frac{1}{\lambda^4} - 3 \right) + 3 c_3 \left(2\lambda^2 + \frac{1}{\lambda^4} - 3 \right)^2 \right)$$

Dans cette relation, les c_i sont des constantes spécifiques à chaque matériau. Dans le cas de l'Ecoflex 00-50, $c_1 = 19000$ Pa, $c_2 = 900$ Pa et $c_3 = -4,75$ Pa^{ref.33}. Par ailleurs, la formule de la pression de Laplace, appliquée par analogie à la membrane d'épaisseur e donne $\Delta P = \frac{2\sigma}{R} = \frac{2e\sigma_Y}{R}$ où la contrainte σ joue le rôle de la tension superficielle. La géométrie du dispositif schématisée en Figure 4b (encadré en pointillés violets) conduit à la relation $R = \frac{r^2+h^2}{2h}$. De plus, l'Ecoflex étant incompressible, on peut écrire l'hypothèse d'incompressibilité $e = \frac{e_0}{\lambda^2}$. On obtient ainsi $\Delta P = \frac{4e_0h}{r^2+h^2} \frac{1}{\lambda^2} \sigma$ avec $\lambda = \frac{R\theta}{2r} = \frac{r^2+h^2}{2rh} \sin^{-1} \left(\frac{2rh}{r^2+h^2} \right)$. Le volume de la chambre (calotte sphérique) étant relié à h et r par $V = \frac{\pi h^2(3r-h)}{3}$, on a la relation $V = f(\Delta P)$ que l'on peut comparer aux résultats expérimentaux.

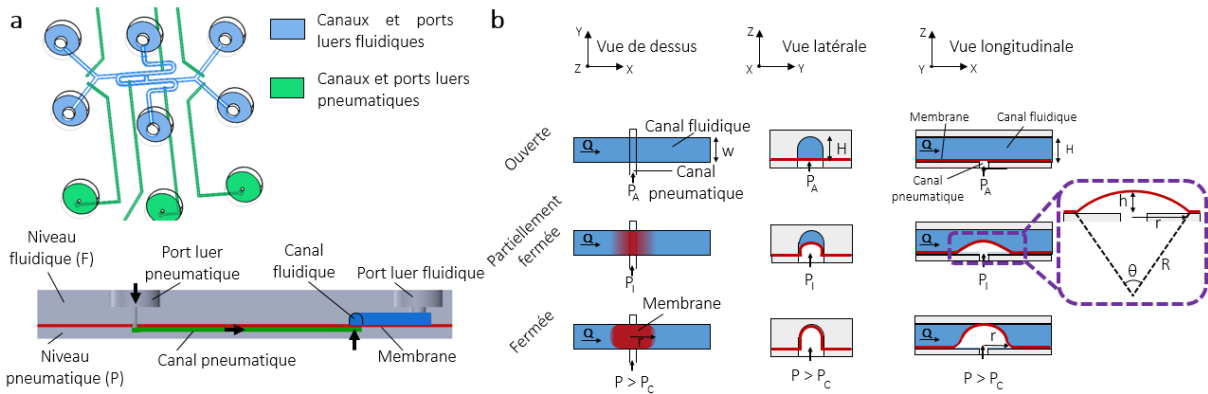


Figure 4 : Aperçu du principe de fonctionnement de la membrane hyperélastique. **a.** Vue 3D Solidworks (en haut) de la puce microfluidique, constituée d'une membrane hyperélastique enfermée entre un niveau fluide et un niveau pneumatique, et vue en coupe (en bas) montrant le chemin emprunté pour déformer la membrane (flèches noires), **b.** Vues schématiques en coupe des vannes hyperélastiques intégrées sur la puce dans les trois états possibles (ouverte, partiellement fermée, fermée).

3 Résultats

3.1 Modélisation de la membrane hyperélastique dans une puce microfluidique dédiée

Afin que le réseau de vannes microfluidiques soit compatible avec la taille des îlots (allant de $50 \mu\text{m}$ à $500 \mu\text{m}$), nous avons déjà évoqué le fait qu'il faut envisager un autre matériau que le PDMS, qui présente des taux de déformation trop faibles. En effet, pour que les vannes soient opérationnelles, la membrane doit être déformée de la hauteur du canal, qui doit lui-même être plus grand que les îlots pancréatiques pour ne pas les écraser. La grande élasticité du matériau Ecoflex permet des pressions d'actionnement très faibles, ce qui est un réel avantage en termes de simplification de l'instrumentation et d'intégration. Cependant, l'étude de la déformation d'un tel matériau est classiquement faite grâce à des tests de soufflage, mais ceux-ci ne correspondent pas à notre configuration expérimentale sur puce. En effet, l'Ecoflex étant un matériau souple, il est possible d'avoir des glissements lors de son encastrement dans la puce microfluidique. De plus, avant de refermer les puces microfluidiques sur l'Ecoflex, ce dernier est précontraint pour un collage optimal dans la structure en sandwich de la puce microfluidique. Il est donc difficile de savoir si les résultats d'un test de soufflage classique sont toujours valables dans un tel dispositif. Ainsi, une caractérisation de la déformation de la membrane directement sur la puce microfluidique était nécessaire. Pour étudier précisément le comportement de la membrane, nous avons choisi un modèle de déformation hémisphérique, qui peut être facilement adapté pour décrire l'actionnement des vannes dans la puce spécifique aux expériences sur les îlots pancréatiques. La puce conçue pour réaliser ces expériences préliminaires est donnée en Figure 5 : au fur et à mesure que l'on injecte du liquide

en entrée du canal fluïdique, la membrane se déforme jusqu'à épouser la forme de la chambre hémisphérique creusée dans le niveau pneumatique.

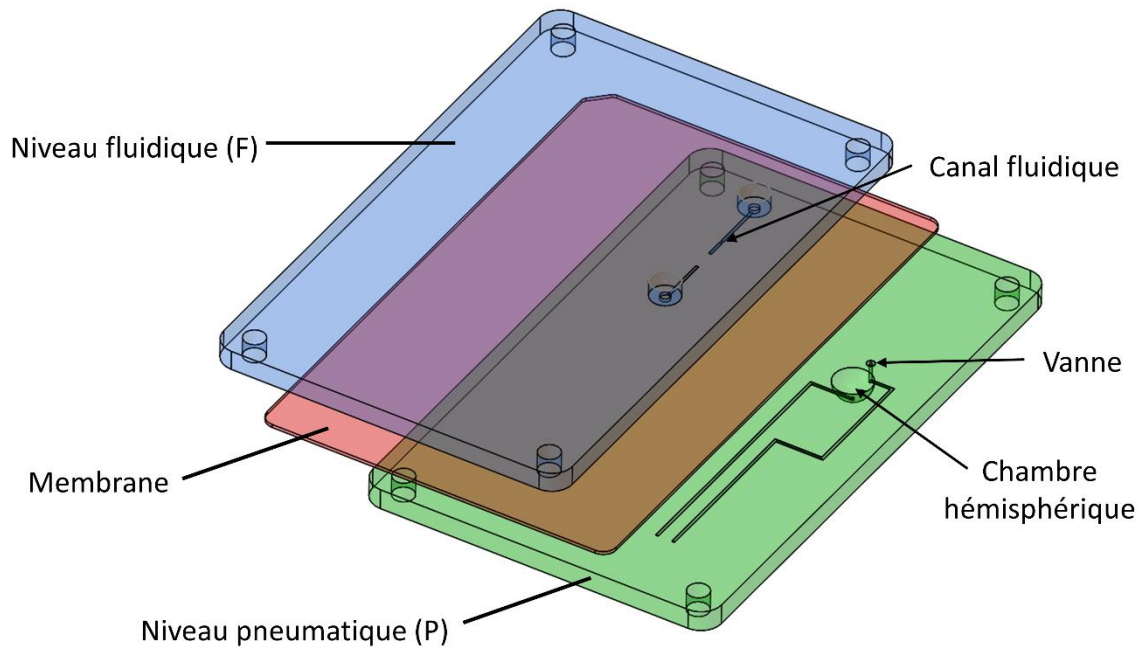


Figure 5 : Vue éclatée 3D Solidworks de la puce microfluidique dédiée à l'étude de la déformation hémisphérique de la membrane.

Les résultats des expériences mesurant les relations contrainte-déformation pour les matériaux mous ont depuis longtemps montré que la théorie linéaire de l'élasticité, en particulier la loi de Hooke utilisée depuis le 17^{ème} siècle, était inappropriée pour caractériser les nouveaux matériaux à fort taux d'allongement^{34,35}. Une nouvelle théorie, qui a donné lieu à divers modèles, est basée sur une fonction de densité d'énergie de déformation³⁶. Nous avons examiné si ces différents modèles permettaient de décrire convenablement notre configuration expérimentale. Le lecteur intéressé peut se reporter à la publication Quintard et al.³⁷, dans les actes du Congrès Français de Mécanique 2019, pour plus de détails. Il ressort de cette étude que c'est la loi de Yeoh, assortie d'un jeu de coefficients donné en section 2.9, qui est la mieux à même de modéliser la configuration expérimentale.

Dans la puce microfluidique considérée, constituée d'une chambre alimentée par un capillaire lui-même relié à un contrôleur en pression (Fig. 6a), une vanne était maintenue fermée en aval pendant le remplissage de la chambre. Le but de l'expérience était de mesurer le volume de liquide injecté sous la membrane pour une pression donnée. Pour ce faire, une caméra a filmé l'avancement du ménisque formé par le liquide dans le capillaire en fonction de la pression imposée par le contrôleur en pression. La chambre était laissée à la pression atmosphérique P_A grâce à la vanne en aval de la chambre maintenue fermée (pressurisée à $P_+ = 500$ mbar) (Fig. 6b). Une pression a alors été appliquée à l'entrée du tube par le contrôleur en pression et

augmentée par pas de 10 mbar tandis que l'avancement du ménisque était mesuré à chaque pas de pression (Fig. 6c). Une relation entre le volume de liquide injecté dans la chambre et la pression imposée par le contrôleur de pression a ainsi été trouvée (Fig. 6d, voir Annexe B pour le code MATLAB permettant le tracé des courbes). Les expériences ont été réalisées sur des chambres de volumes 30 μL et 200 μL , pour des pressions allant de 0 mbar à 70 mbar et 150 mbar respectivement. La Figure 6d montre un excellent accord entre les courbes théoriques et expérimentales, validant ainsi notre modèle de déformation de la membrane dans la puce microfluidique.

Ces résultats démontrent la possibilité de faire fonctionner le dispositif microfluidique présenté avec de faibles pressions (< 1 bar), ainsi que la pertinence d'utiliser le modèle de matériau hyperélastique de Yeoh pour décrire la déformation de la membrane. Par ailleurs, la possibilité de fermer les vannes à façon pourrait être d'un grand intérêt pour de nombreuses applications, afin de contrôler précisément les flux dans les différentes branches des circuits microfluidiques.

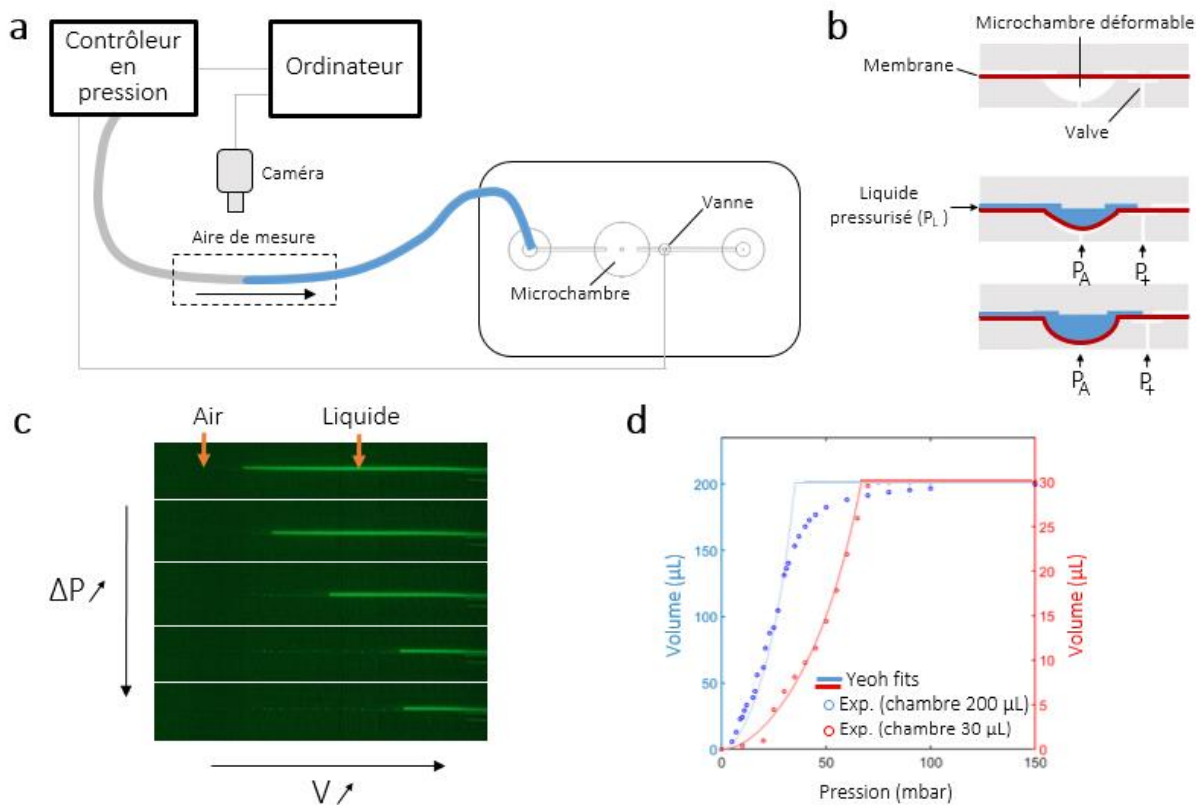


Figure 6 : Etude de la déformation hémisphérique de la membrane à partir de la détermination du volume d'une microchambre étirable. **a.** Schéma du montage expérimental, **b.** Vue schématique en coupe de la microchambre. La membrane hyperélastique a été étirée jusqu'à sa capacité maximale définie par le fraisage de la couche pneumatique, **c.** Mesure de l'avancement du ménisque lors de l'augmentation de la pression à l'aide du contrôleur en pression, **d.** Relation entre le volume de liquide injecté dans la microchambre et la pression imposée par le contrôleur de pression : comparaison des résultats expérimentaux avec les résultats expérimentaux avec la loi de Yeoh.

3.2 Validation des vannes pour la puce microfluidique de perfusion d'îlots de Langerhans

Nous avons utilisé ce modèle pour dimensionner les vannes et les microcanaux des puces microfluidiques dédiées à la perfusion d'îlots pancréatiques humains (Fig. 7a). Les microcanaux de la puce microfluidique présentent une forme hémicylindrique et mesurent 400 μm de largeur et 400 μm (canal principal) ou 200 μm (canaux latéraux) de hauteur. L'objectif ici était d'établir les ordres de grandeur de la pression nécessaire pour déformer la membrane en fonction de la hauteur de ces microcanaux. Dans la configuration présentée, la déformation de la membrane n'a plus la forme d'une calotte sphérique symétrique car la membrane se retrouve contrainte latéralement par les parois du microcanal fluide. Néanmoins, le modèle de Yeoh précédemment décrit reste valable du fait qu'une petite délamination locale est observée au niveau des vannes après de multiples actionnements à 1 bar, permettant d'approximer la déformation par une portion de cercle de rayon r (d'environ la hauteur du canal fluide) dans le plan longitudinal et de rayon $\frac{r}{2}$ et dans le plan latéral (Fig. 4b).

Pour déterminer les seuils d'étanchéité des vannes de manière expérimentale, des injections continues de microbilles fluorescentes (à $Q = 10 \mu\text{L}/\text{min}$) ont été réalisées. Les vannes ont été actionnées à différentes pressions pneumatiques P_p et les mouvements des microbilles ont été enregistrés à chaque pas de pression. L'étanchéité des vannes a été assignée à la pression à partir de laquelle les billes cessent de bouger. Pour ce faire, les images consécutives des films bruts ont été soustraites à l'aide d'ImageJ, afin de ne garder que les objets en mouvement d'une image à l'autre, et ainsi mettre en évidence les microbilles en mouvement. Ainsi, les flux dans les microcanaux étaient visualisés par les traces blanches laissées à l'image par les microbilles en mouvement, et aucun signal ne résultait des zones où les microbilles étaient immobiles. Des expériences ont été faites au niveau de 3 vannes (V_7 , V_2 et V_3) sur 4 circuits microfluidiques différents avec des résultats similaires, et les résultats pour les vannes V_7 et V_2 sont montrés à titre d'exemple en Figure 7c. Pour la vanne V_7 , lorsque la vanne était ouverte, les billes suivaient à la fois le chemin A et le chemin B. Lorsque la vanne était partiellement ouverte, les billes s'écoulaient toujours par les chemins A et B, mais le débit dans le chemin A diminuait tandis que le débit dans le chemin B s'intensifiait. Lorsque la vanne était fermée de façon étanche, les billes s'écoulaient uniquement par le chemin B (Fig. 7c, en haut). Pour la vanne V_2 , comme il n'y avait qu'un seul chemin possible, les microbilles s'écoulaient le long du canal pour une pression inférieure à la pression seuil, et cessaient de s'écouler après l'actionnement de la vanne pour une pression supérieure à la pression seuil (Fig. 7c, bas). Les flèches blanches sur les figures montrent la direction de l'écoulement dans chaque cas.

Les expériences ont ainsi montré des seuils d'étanchéité de 500 mbar pour le canal principal en serpentin de 400 μm de profondeur (V_7 et V_2) et de 350 mbar pour les canaux latéraux de 200 μm de profondeur (V_3). Appliqué à cette configuration, le modèle de déformation de Yeoh garantit l'étanchéité des vannes avec des pressions de travail supérieures à 400 mbar pour les

vannes situées dans le canal principal et supérieures à 250 mbar pour les vannes situées dans les canaux latéraux (Fig. 7d). L'écart entre les seuils donnés par le modèle de Yeoh et les seuils expérimentaux peut être attribué au fait que l'étanchéité complète des vannes se produit à une pression légèrement supérieure à celle requise pour déformer la membrane de la hauteur exacte du canal. De plus, les seuils d'étanchéité dépendent également du débit et de l'épaisseur exacte de la membrane. Pour ces raisons, nous avons préféré travailler avec une marge assurant l'étanchéité des vannes dans les conditions expérimentales. Ces vannes peuvent être activées un grand nombre de fois sans qu'aucun vieillissement ne soit remarqué.

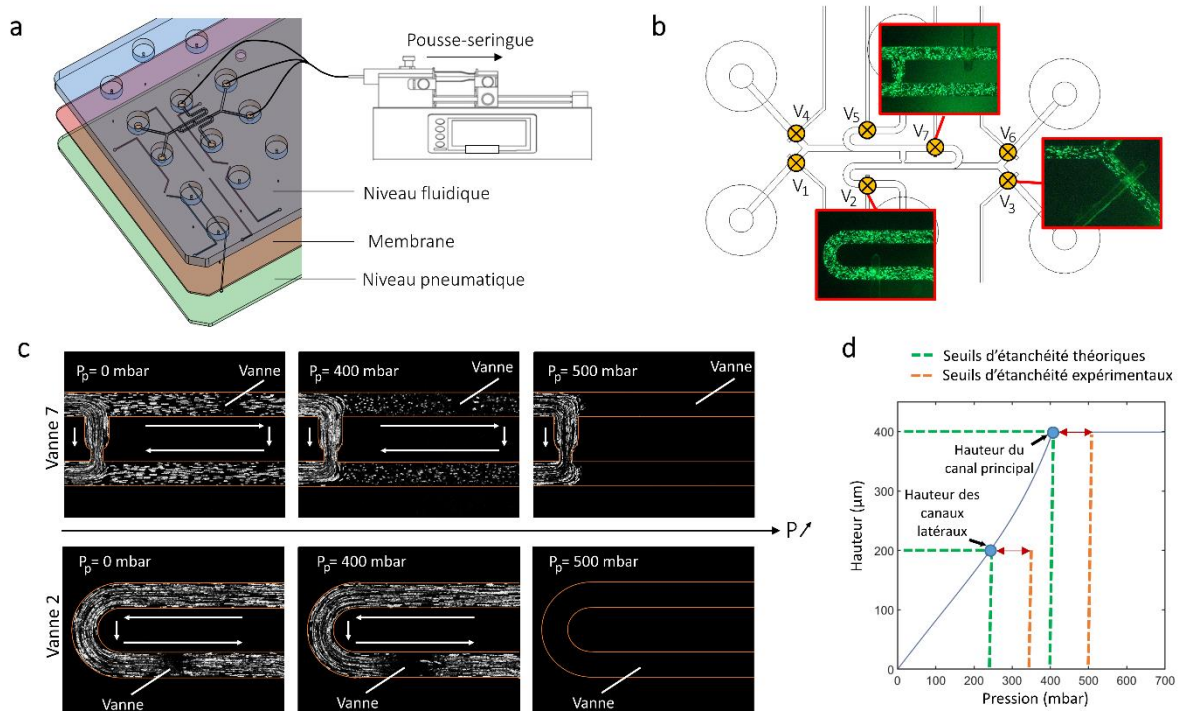


Figure 7 : Validation des vannes dans la puce de test GSIS. **a.** Vue éclatée 3D Solidworks de la puce microfluidique dédiée aux expériences de test GSIS, **b.** Vue de dessus des microcanaux fluidiques et de l'emplacement des vannes. La perfusion de microbilles fluorescentes a été enregistrée autour de V_7 , V_2 et V_3 (encadrés rouges), **c.** Projection maximale d'intensité sur un stack de 5 images, mettant en évidence les traces des microbilles circulant dans les microcanaux, **d.** Comparaison des seuils de pression d'étanchéité des vannes obtenus expérimentalement et prédits par le modèle de Yeoh.

L'ensemble de ces résultats confirme le bon fonctionnement du montage microfluidique avec des pressions inférieures à 1 bar. Cette conception répond aux nombreuses difficultés conventionnelles : (1) la capacité d'isoler et de localiser automatiquement un îlot individuel grâce au piégeage hydrodynamique en serpentin, (2) un apport suffisant d'oxygène et de glucose grâce à la perfusion microfluidique continue, (3) une production d'insuline détectable grâce à des faibles volumes morts mis en jeu et des faibles débits accessibles. De plus, grâce au comportement hyperélastique de la membrane, les vannes présentent des déformations

suffisamment importantes pour être directement intégrées dans les canaux fluidiques, sans déformer l'îlot ni recourir à des méthodes de fabrication complexes. Lorsqu'elles sont ouvertes, les vannes n'induisent aucune perte de pression dans les canaux. Enfin, les vannes peuvent être fermées de manière parfaitement étanche à des pressions inférieures à 1 bar.

Précisons que plusieurs géométries (circulaires, carrées, rectangulaires etc.) et emplacements dans le circuit fluidique (soit dans la partie droite du canal, soit dans le virage) des vannes ont été testés (Fig. 8). Nous n'avons remarqué aucune différence significative entre ces différentes options, mais un travail d'optimisation serait nécessaire pour concevoir des vannes étanches dès la première utilisation.

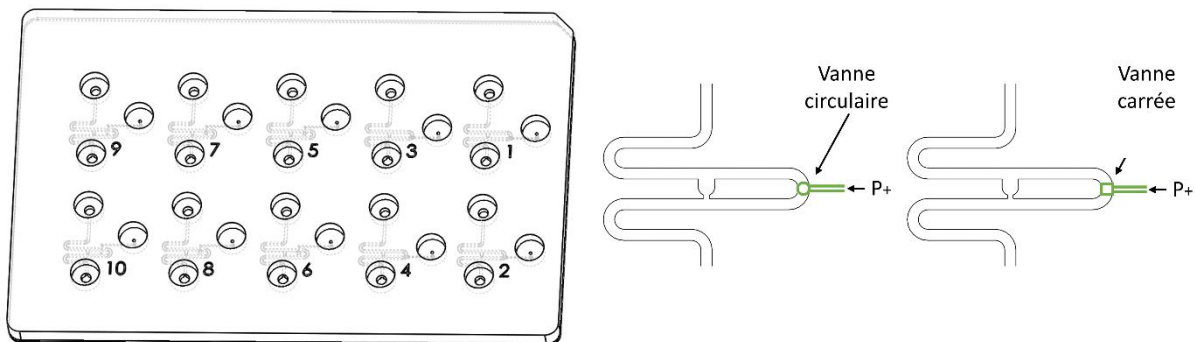


Figure 8 : Puce microfluidique dédiée à des tests de dimensionnement des vannes en fonction de leur géométrie et de leur emplacement dans le circuit fluidique.

3.3 Piégeage des îlots et taux de cisaillement associés

Pour déterminer le cisaillement imposé à l'îlot pendant le protocole de test GSIS, l'écoulement dans le canal principal en serpentin a été modélisé à l'aide de COMSOL Multiphysics. S'il a déjà été démontré que la perfusion microfluidique continue affecte positivement la fonction et la survie des îlots de Langerhans³⁸, un taux de cisaillement trop élevée peut provoquer une déformation des cellules et entraîner des dommages permanents³⁹. Des conditions expérimentales aux limites ont été choisies, de telle sorte que la pression atmosphérique a été assignée à l'entrée du canal et un débit de 100 $\mu\text{l}/\text{min}$ ou 2,5 $\mu\text{l}/\text{min}$ a été assigné à sa sortie (Fig. 9a). Rappelons que l'îlot doit être piégé rapidement au début, à la fois pour éviter sa sédimentation dans le réservoir d'entrée et pour permettre un piégeage rapide. Le débit peut ensuite être réduit pour les phases de sécrétions afin de suffisamment concentrer l'insuline. Dans les deux cas, l'îlot ne doit pas subir une contrainte de cisaillement trop importante. La vanne forçant le flux vers le piège a été modélisée par un bloc solide qui ne permet aucun flux dans le canal associé à la boucle (chemin A) lorsqu'il est activé. Lorsque la vanne n'est pas actionnée, la configuration revient à celle déjà décrite dans la littérature scientifique^{22,23}, où l'écoulement se fait préférentiellement par le chemin A, protégeant ainsi l'îlot du cisaillement (Fig. 9b). Lorsque la vanne est fermée (condition nécessaire pour les phases de stimulations bas et haut glucose), l'écoulement est forcé par le chemin B. Cependant, comme le débit est considérablement réduit, la contrainte de cisaillement associée est inférieure d'un ordre de

grandeur par rapport à la configuration de la vanne ouverte (Fig. 9c). Les valeurs des contraintes de cisaillement prédites sur la périphérie de l'îlot restent très inférieures à celles de > 10 Pa habituellement considérées comme causant des dommages aux îlots⁴⁰ (Fig. 9d). Une analyse plus fine devrait tenir compte de la déformabilité de l'îlot ainsi que de sa porosité, mais nous avons cherché ici à établir des ordres de grandeur. Ainsi, ces résultats indiquent que dans notre configuration, un îlot n'est pas soumis à des contraintes de cisaillement problématiques pendant le test GSIS sur puce. Il convient de noter que le débit peut être contrôlé de façon continue dans la boucle (chemin A) *via* un actionnement plus ou moins fort de la membrane hyperélastique, de sorte que la contrainte de cisaillement appliquée à l'îlot peut également être contrôlée de cette façon.

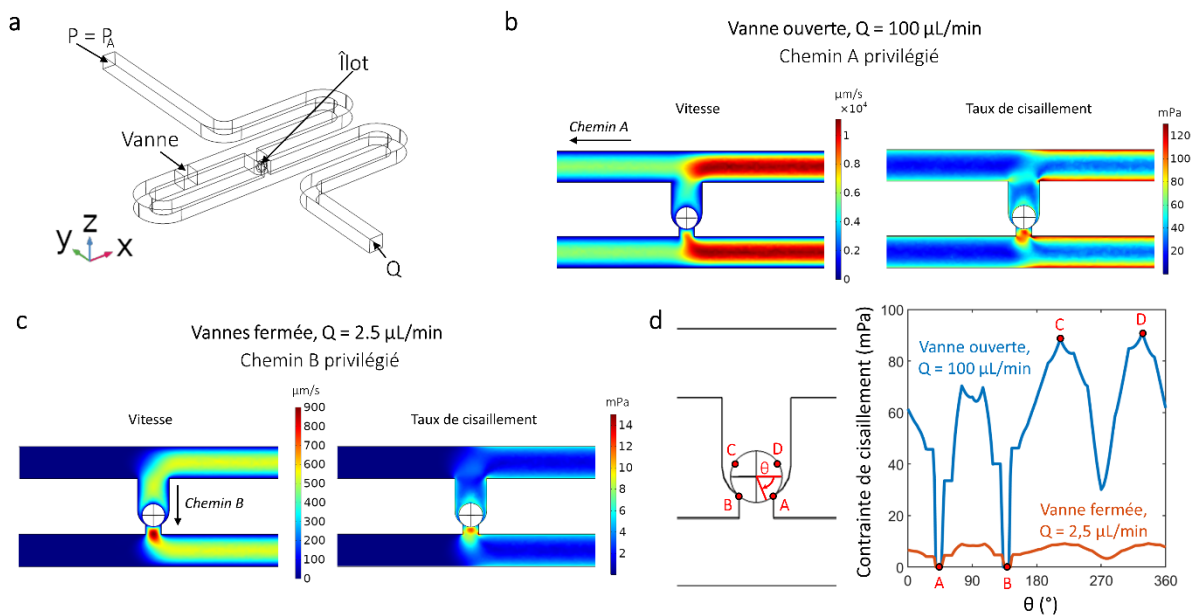


Figure 9 : Evaluation de la contrainte de cisaillement infligée à l'îlot pendant le test GSIS à l'aide de COMSOL Multiphysics. **a.** Rendu 3D COMSOL du microcanal en forme de serpent avec les conditions aux limites, **b-c.** Champs de vitesse et du taux de cisaillement le long du plan médian du canal près du site du piège avec la vanne ouverte (b) ou fermée (c), **d.** Contrainte de cisaillement le long de la ligne de circonférence de l'îlot.

3.4 Validation du protocole fluide et perfusion de l'îlot

Pour valider le fonctionnement fluide de notre dispositif microfluidique, nous avons réalisé des expériences en utilisant des colorants alimentaires dilués dans un tampon KREBS. Les différents chemins possibles pour le liquide sont ainsi visualisés en blanc (remplissage initial), vert (piégeage de l'îlot), jaune (bas glucose) et rouge (haut glucose). Dans ce qui suit, par souci de clarté, nous appellerons les solutions modèles colorées jaune et rouge LGS et HGS respectivement, en relation avec les étapes correspondantes du protocole en conditions réelles.

Le dispositif expérimental consiste en une puce microfluidique reliée à un pousse-seringue par ses trois sorties. La puce est placée dans une chambre thermostatique avec un b cher d'eau pour éviter l'évaporation. Les vannes sont actionnées par un contrôleur de pression connecté aux canaux pneumatiques de la puce et   un ordinateur pour l'automatisation du protocole (Fig. 10a). L'actionnement des vannes est réalisé à l'aide d'un contrôleur de vannes pneumatique (LineUp P-Switch, Fluigent) connecté à un contrôleur de pression (Flow-EZ, Fluigent). La séquence d'actionnement des vannes correspondant à un protocole donné peut être automatisé à l'aide du logiciel Microfluidic Automation Tool (Fluigent). Trois tubes de même longueur sont connectés à une seule seringue sur le pousse-seringue *via* des connecteurs à jonction en T. Les différents liquides introduits dans la puce microfluidique peuvent ainsi être dirigés vers les tubes (1), (2) ou (3) selon que la vanne V_2 , V_3 ou V_6 respectivement, est ouverte (Fig. 10b). Le choix du pousse-seringue a été motivé par la volonté de contrôler l'écoulement en débit plutôt qu'en pression. En effet, lors d'un test GSIS, l'insuline doit être collectée dans un volume donné contenant les sécrétions de l'îlot pendant un intervalle de temps donné.

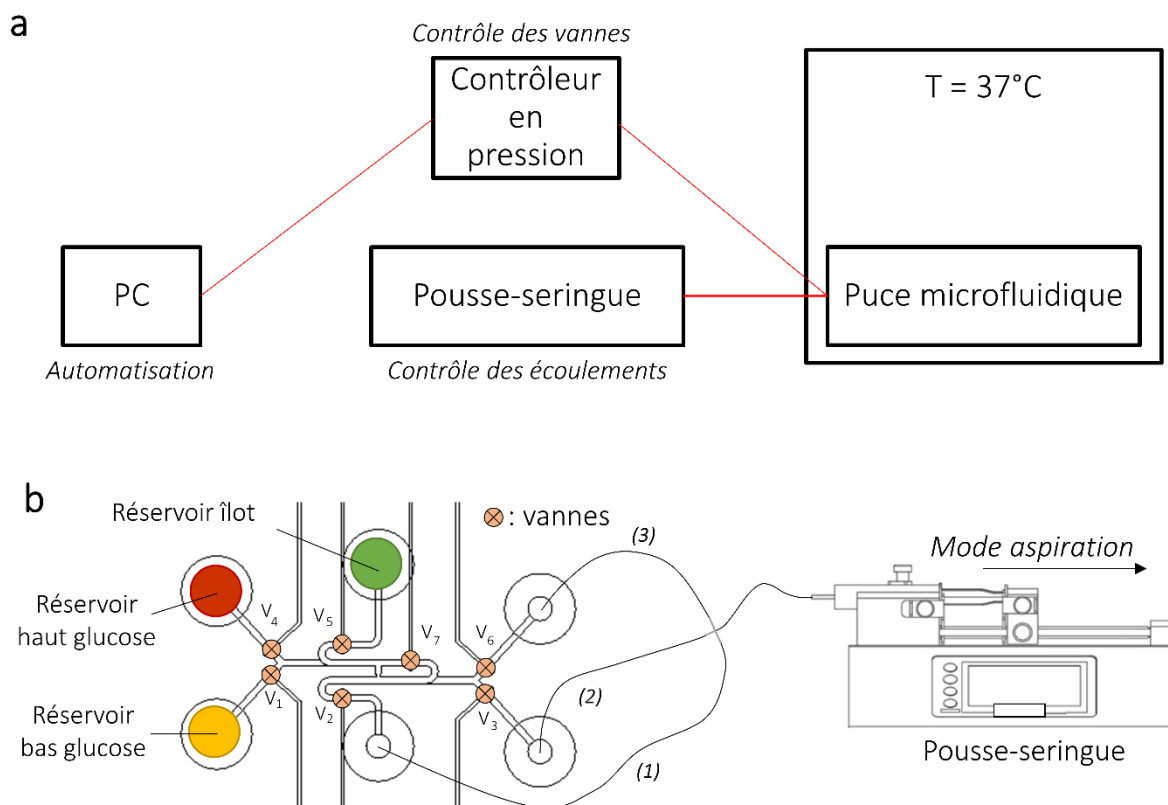


Figure 10 : **a.** Schéma du dispositif expérimental, **b.** Principe de fonctionnement de la plateforme microfluidique : les différents réactifs sont injectés dans la puce microfluidique à l'aide d'un pousse-seringue fonctionnant en mode aspiration. Le réseau de vannes, connecté à un contrôleur en pression, permet de diriger les liquides vers différents chemins d'écoulement.

D'un point de vue pratique, on préfère utiliser une chambre thermostatée à 37°C plutôt qu'un incubateur classique. En effet, la partie électronique du montage expérimental ne peut être placée dans un environnement humide et doit donc être déportée hors de l'incubateur. En utilisant une petite chambre thermostatée facilement portable, on peut concevoir un dispositif expérimental sur une paillasse avec un encombrement réduit (Fig. 11).

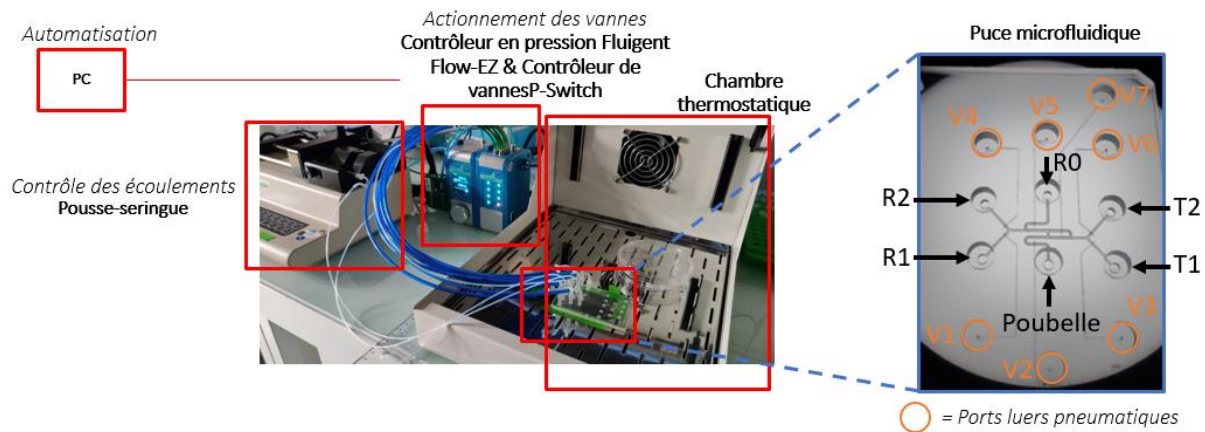


Figure 11 : Montage expérimental pour le test GSIS sur puce automatisé. Photographie du montage expérimental montrant les différents éléments de la plateforme microfluidique, avec une vue détaillée de la puce microfluidique (encadré).

Des expériences ont alors pu être conduites avec des îlots pancréatiques humains sur ce montage expérimental. Tout d'abord, les microcanaux ont été remplis de solution tampon par capillarité. Les vannes V_3 et V_6 ont été fermées pendant ce processus afin de garder les sorties vierges de tout liquide, toutes les autres vannes étant ouvertes (Fig. 12 (1)). Un îlot humain a alors été déposé dans le réservoir d'entrée à l'aide d'une pipette, et a été injecté dans le microcanal à $Q = 100 \mu\text{L}/\text{min}$ par le chemin serpentin principal (vers le tube 1), les vannes V_1 , V_3 , V_4 et V_6 étant fermées et V_2 , V_5 et V_7 ouvertes. Il se retrouve piégé selon le principe hydrodynamique déjà largement décrit dans ce manuscrit. La phase de pré-incubation a été réalisée par la perfusion de LGS (solution bas glucose) dans le canal principal serpentin en utilisant la même configuration de vannes, c'est-à-dire V_1 , V_3 , V_4 et V_6 fermées et V_2 , V_5 et V_7 ouvertes (Fig. 12 (2)). Pour une stimulation à faible taux de glucose, étant donné qu'une fois l'îlot piégé, $Q_A > Q_B$, l'écoulement se fait préférentiellement par le chemin A. Ainsi, la vanne V_7 doit être fermée pour forcer le flux à passer par le chemin B afin de collecter les sécrétions de l'îlot sans être trop diluées. Les vannes V_4 et V_6 ont été maintenues dans leur positions fermées, tandis que V_2 et V_5 du canal serpentin ont été fermées. Les vannes V_1 et V_3 ont été ouvertes pour réaliser la stimulation par la LGS (bas glucose) et la collecte du surnageant (Fig. 12 (3)). L'échantillon LGS est ainsi collecté dans le tube 2. De la même manière, la stimulation par la HGS (haut glucose) et la collecte du surnageant nécessitent la fermeture des vannes V_1 et V_3 et l'ouverture des vannes V_4 et V_6 (Fig. 12 (4)). V_2 , V_5 et V_7 ont été maintenues dans leur positions fermées. L'échantillon HGS est ainsi collecté dans le tube 3.

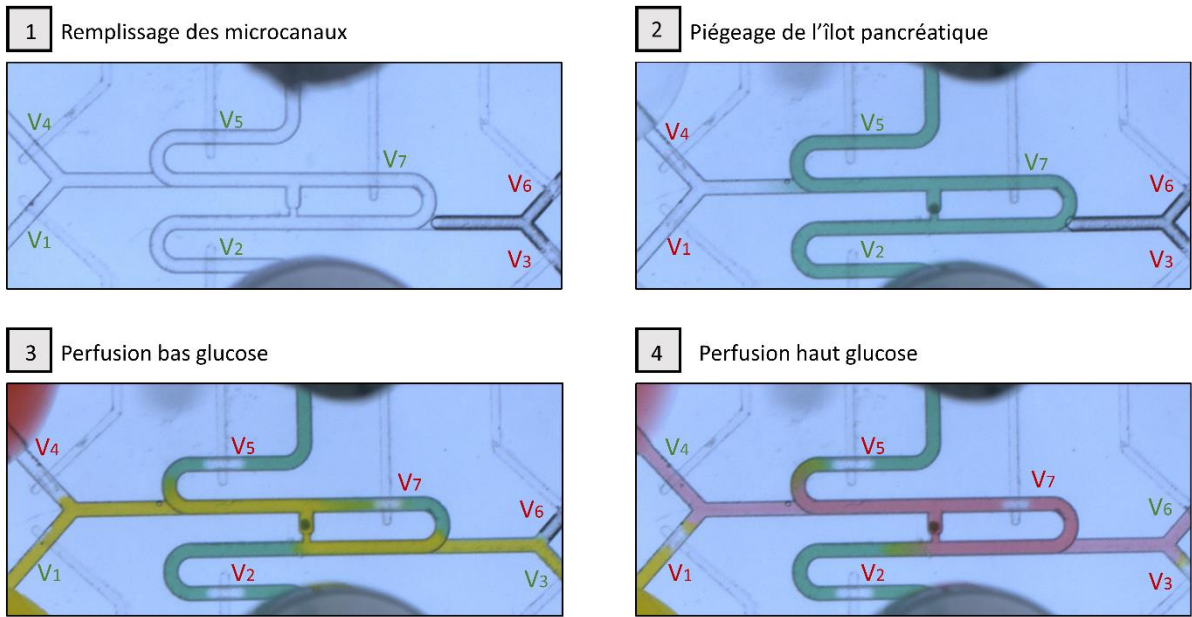


Figure 12 : Validation fluidique du protocole de test GSIS en utilisant des solutions colorées : remplissage initial de la puce (1), injection de l'îlot (2), stimulation à bas glucose et collecte (3), stimulation à haut glucose et collecte (4). Dans chacune des configurations, les vannes fermées sont annotées en rouge, et les vannes ouvertes en vert.

À la fin du test GSIS, l'îlot peut être récupéré pour d'autres analyses (par exemple, l'examen de sa viabilité ou de son contenu total en insuline). Pour ce faire, les vannes V₁, V₃, V₄, V₆ et V₇ doivent être fermées et V₂ et V₅ ouvertes. L'îlot peut ainsi être poussé vers le réservoir d'entrée à l'aide du pousse-seringue dans son mode de fonctionnement direct cette fois-ci (mode infusion, *i.e.* le pousse-seringue pousse sur le piston de la seringue). Toutes les étapes du protocole avec les ouvertures et fermetures de vannes correspondantes sont résumées dans le Tableau 1.

	V ₁	V ₂	V ₃	V ₄	V ₅	V ₆	V ₇	Q (μ l/min)
Remplissage initial	O	O	F	O	O	F	O	/
Injection de l'îlot	F	O	F	F	O	F	O	100
Pré-incubation (phase 1)	F	O	F	F	O	F	O	2,5
Bas glucose (phase 2)	O	F	O	F	F	F	F	2,5
Haut glucose (phase 3)	F	F	F	O	F	O	F	2,5
Récupération de l'îlot	F	O	F	F	O	F	F	2,5

Tableau 1: Résumé de la séquence d'actionnement des vannes durant le protocole de test GSIS sur puce. O = Ouverte, F = Fermée.

Pour valider la fonctionnalité de l'îlot sur puce, nous avons adapté un protocole classique de test GSIS en culture statique à notre configuration dynamique microfluidique. Il s'agit d'une première perfusion à $Q = 2,5 \mu\text{L}/\text{min}$ avec une solution de glucose 2,8 mM pendant 1 h (phase de pré-incubation), suivie d'une perfusion de 1 h avec une solution de glucose 2,8 mM (stimulation bas glucose) et d'une perfusion de 1 h avec une solution de glucose 16,7 mM (stimulation haut glucose). Pour chaque îlot, les volumes de liquides perfusés ont été recueillis dans les tubes de sortie pour les conditions bas (tube 2) et haut glucose (tube 3), soit deux échantillons de 150 μL pour une quantification ultérieure *via* un test ELISA. Les résultats montrent des indices de stimulation (SI) supérieurs à l'unité, ce qui signifie que l'insuline sécrétée par les îlots sur puce a augmenté de manière significative entre la phase de stimulation bas glucose et la phase de stimulation haut glucose. Plus précisément, les îlots pancréatiques provenant de InSphero (donneur 1) ont montré un indice de stimulation de $2,8 \pm 0,9$ et $2,4 \pm 0,7$ dans les conditions statiques et sur puce respectivement (moyenne \pm écart-type, $n=8$ pour chaque condition). Les îlots pancréatiques issus de l'hôpital de Montpellier (donneur 2) ont montré un indice de stimulation de $1,5 \pm 0,7$ et $1,4 \pm 0,4$ dans des conditions statiques et sur puce respectivement (moyenne \pm écart-type, $n=3$ pour chaque condition). Dans l'ensemble, les indices de stimulation obtenus sont similaires entre les cultures statiques (contrôles) et les expériences sur puce, validant ainsi la robustesse de notre dispositif microfluidique pour la réalisation d'un test GSIS (Fig. 13a). De plus, comme précédemment évoqué, un indice de stimulation supérieur à 1 démontre la bonne fonctionnalité des îlots, et donc que l'Ecoflex n'induit pas de toxicité. Bien que ce dernier point ait déjà été démontré dans différentes études⁴¹⁻⁴³, nous avons réalisé des tests de viabilité pour nous assurer de la non-toxicité de

notre dispositif et de notre protocole sur les îlots pancréatiques. Des tests de viabilité ont été réalisés après le test GSIS en puits ($n=4$ îlots individuels, donneur 1) et sur puce ($n=3$ îlots individuels, donneur 1) *via* un double marquage SYTO13 / Iodure de propidium (IP) (Fig. 13b). La viabilité reste supérieure à 90 % après le test GSIS dans les conditions statiques et sur puce, sans différence significative entre les deux conditions. Cela valide également la biocompatibilité de notre dispositif.

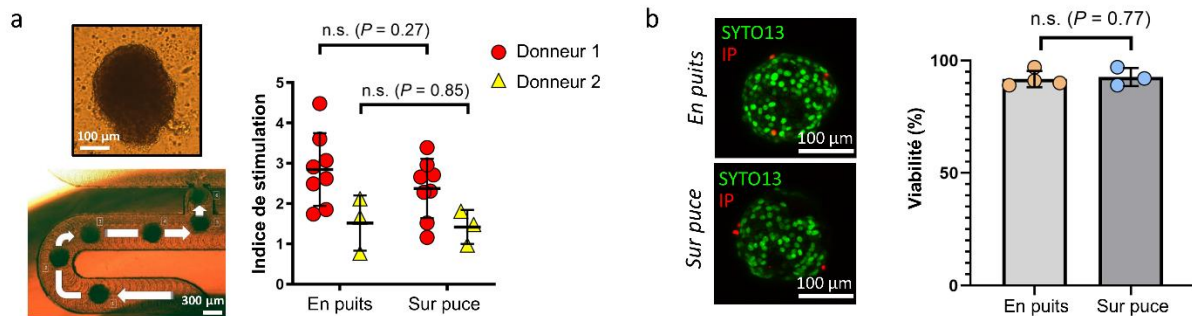


Figure 13 : **a.** Image représentative d'un îlot humain piégé dans la puce microfluidique (à gauche) et comparaison de l'indice de stimulation entre les conditions statique (en puits) et dynamique (sur puce). Chaque point du graphique représente l'indice de stimulation d'un îlot pancréatique obtenu à partir de la mesure de deux échantillons (bas et haut glucose), **b.** Rendu de la projection maximale d'intensité (z-stack) d'un seul îlot marqué au SYTO13 et à l'IP après le test GSIS (à gauche, les images sont représentatives de $n=4$ et $n=3$ îlots testés dans des conditions statique et dynamique respectivement). Comparaison de la viabilité des îlots après le test GSIS en puits ou sur puce (à droite). Chaque point du graphique correspond à un îlot pancréatique. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne \pm écart-type. Un t-test pour les comparaisons a été effectué à l'aide du logiciel GraphPad Prism 9 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

L'ensemble de ces résultats démontre la capacité du dispositif microfluidique présenté à diriger facilement les flux à l'aide d'un réseau de vannes pouvant être intégrées dans le circuit fluidique. Le dispositif que nous avons développé permet la réalisation d'un test GSIS sur un seul îlot sur puce et donne des résultats similaires aux conditions statiques classiques. La fonction de piégeage de l'îlot dans le dispositif permet un positionnement automatique de l'îlot, mais aussi, en inversant la direction du flux, de récupérer l'îlot pour une analyse hors puce après les expériences. Par rapport aux méthodes conventionnelles où de nombreuses opérations manuelles sont nécessaires, notre plateforme microfluidique permet de réaliser un test GSIS de manière entièrement automatisée, sans recours à des techniques complexes.

Ce travail ouvre aussi la porte vers de nouvelles perspectives. D'abord, comme l'approche microfluidique génère de très faibles volumes morts, la cinétique de la sécrétion d'insuline de chaque îlot pourrait être déterminée en recueillant des échantillons à de courts intervalles de temps. En outre, la médecine régénératrice avec la transplantation d'îlots de Langerhans, une

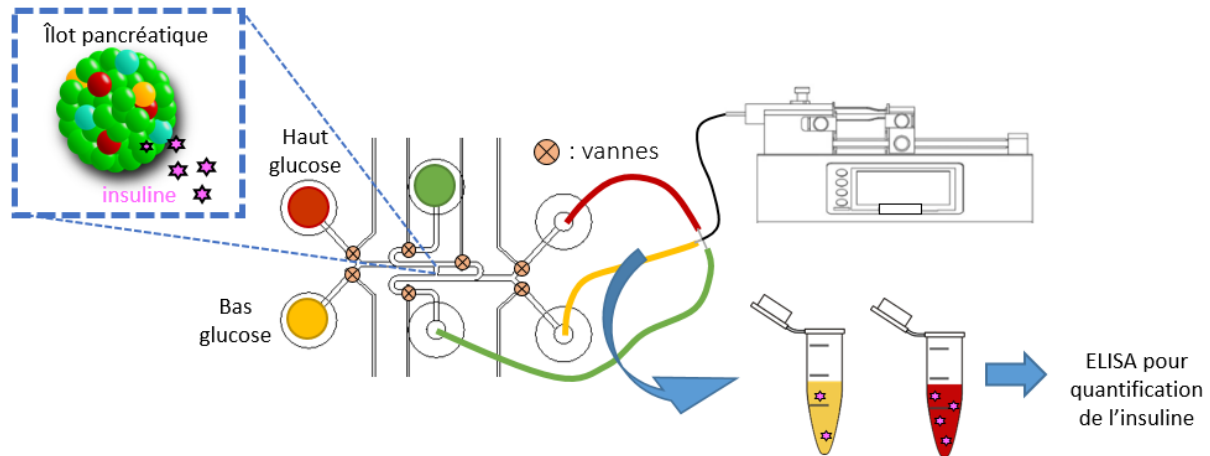
thérapie cellulaire pour le diabète, s'est imposée depuis une décennie comme un traitement efficace et prometteur pour rétablir un bon contrôle glycémique chez les patients diabétiques insulino-indépendants présentant une forme sévère de diabète⁴⁴. Le dispositif que nous présentons ici pourrait aider à tester et trier rapidement les meilleurs îlots avant la transplantation. Par ailleurs, il a déjà été montré que cette architecture en serpentif peut être parallélisée pour piéger plusieurs dizaines d'îlots²⁵, ainsi notre dispositif pourrait être facilement adapté pour des applications nécessitant de plus grands rendements. Enfin, cette plateforme microfluidique peut être utilisée pour divers essais biologiques et devrait permettre l'analyse de divers sécrétomes. Bien que le dispositif présenté n'intègre pas encore la détection de l'insuline sur puce, cette technologie basée sur une membrane hyperélastique a déjà été prouvée fiable pour des essais biologiques quantitatifs dans l'un de nos travaux précédents⁴⁵. Certains travaux sont en cours dans nos laboratoires pour développer une plateforme microfluidique entièrement automatisée et intégrée pour l'évaluation de la fonction des îlots pancréatiques.

4 Conclusion

Dans ce Chapitre, nous avons présenté une nouvelle plateforme microfluidique qui fournit des solutions simples pour surmonter les limitations souvent rencontrées avec les systèmes conventionnels de perfusion d'îlots pancréatiques. La possibilité de réduire le nombre d'îlots pancréatiques à un seul îlot et la facilité d'utilisation de notre dispositif sont d'un grand intérêt pour une utilisation clinique. Le piégeage des îlots individuels ainsi que le contrôle temporel et spatial des flux ont été automatisés grâce à un réseau de vannes hyperélastiques faciles à intégrer sur puce. En modifiant le nombre ou la disposition des canaux latéraux, il est possible de personnaliser le dispositif pour une large gamme de tests biologiques. La puce microfluidique peut être améliorée en intégrant en série l'unité de piégeage pour étudier des îlots individuels à un débit plus élevé. A noter que la mise en parallèle des pièges tout en variant leurs dimensions peut être intéressante pour trier les îlots par taille. De même, l'intégration d'une détection d'insuline sur puce⁶ ou d'autres capteurs⁴⁶ serait particulièrement bénéfique. De plus, pour réduire l'encombrement du dispositif global, le pousse-seringue pourrait être remplacé par une pompe péristaltique sur puce fonctionnant sur le principe de la membrane étirable. Enfin, ce travail s'inscrit dans un cadre plus général dans lequel les systèmes microphysiologiques peuvent intégrer une plus grande pertinence physiologique par rapport aux cultures statiques, comme une vascularisation fonctionnelle⁴⁷ (voir Chapitre 3). Ces systèmes modèles bénéficieront à être traités avec des techniques microfluidiques, qui permettent un accès plus direct aux tissus biologiques et un contrôle précis des stimuli.

Annexe A

Cette Annexe détaille le protocole expérimental de mise en œuvre du test GSIS sur puce.



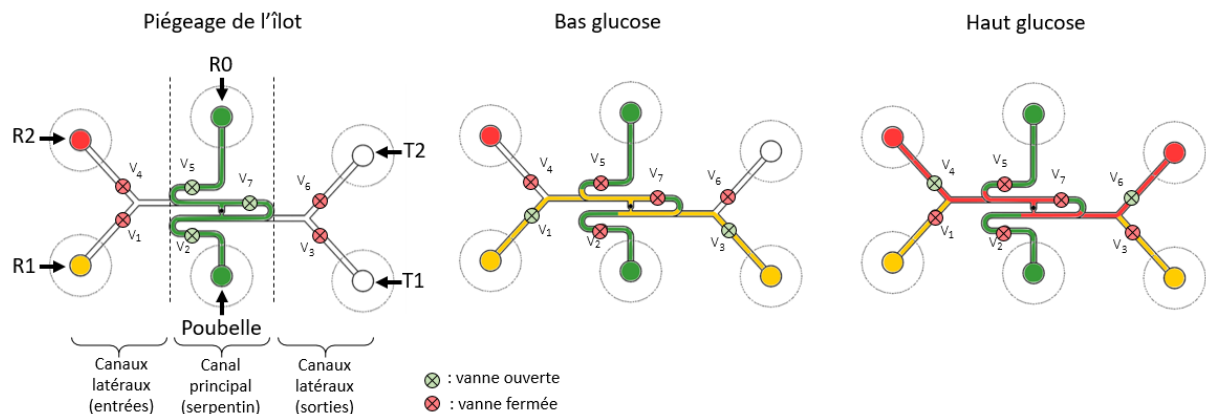
Résumé

- Cette méthode permet de réaliser un test GSIS de manière entièrement automatisée, sur un seul îlot pancréatique, avec des volumes morts réduits.
- La microfluidique basée sur l'utilisation de vannes permet de contrôler facilement les écoulements, offrant ainsi un environnement dynamique aux îlots pancréatiques.
- La sécrétion d'insuline d'un seul îlot pancréatique dans des conditions d'incubation à faible et à forte teneur en glucose peut être collectée dans deux sorties indépendantes pour une quantification ultérieure.

Contexte

Nous présentons ici une méthode pour réaliser un test de sécrétion d'insuline stimulée par le glucose (GSIS) sur un seul îlot pancréatique humain, en utilisant une puce microfluidique décrite dans ce Chapitre. Le design de la puce, dérivé de celui initialement présenté par Tan et Takeuchi, intègre un piégeage hydrodynamique passif de l'îlot. Le processus de fabrication de la puce microfluidique et son architecture détaillée sont décrits plus haut dans ce Chapitre, cependant, le test GSIS que nous décrivons ici peut être adapté à diverses configurations. Ainsi, le protocole peut être adapté à divers échantillons biologiques 3D, dans une architecture plus générale présentant trois entrées, trois sorties et un réseau de vannes pour diriger les flux. Ici, les trois entrées sont désignées par R0 (réservoir d'îlot), R1 (réservoir de la solution bas glucose) et R2 (réservoir de la solution haut glucose). Les trois sorties sont appelées poubelle, T1 (tube pour la collecte de la phase bas glucose) et T2 (tube pour la collecte de l'insuline de la phase

haut glucose). Le protocole GSIS dynamique présenté ici est adapté des protocoles GSIS statiques conventionnels.



Protocole détaillé

Matériel

Pousse-seringue (pousse-seringue perfusion/aspiration KDS Multi série 230, Sigma-Aldrich, cat. no. Z721786), tube en téflon TFE (1,58 mm de diamètre extérieur x 0,8 mm de diamètre intérieur, Supelco, cat. no. 58696-U), Connecteurs Fluidic 263 luer mâle (ChipShop, cat. no. 10000080), Luers mâle en polypropylène (Ark Plas Products, cat. no. LCX71-PP0), Luers femelles en polypropylène (Ark Plas Products, cat. no. LHX15-PP0), seringues de 1 ml (Terumo), chambre thermostatique (GFL, cat. no. 4010), contrôleur en pression (Flow-EZ, Fluigent), contrôleur de vannes (LineUp P-Switch, Fluigent), logiciel Automation Tool (Fluigent), tubes en polyuréthane (4 O.D., Festo), ELISA pour quantifier l'insuline humaine par chimioluminescence STELLUX (ALPCO, n° de cat. 80-INSHU-CH01), îlots pancréatiques et milieux de culture.

Réactifs

- Tampon phosphate salin (PBS) (Gibco, n° de cat. 10010023)
- Tampon Krebs-Ringer HEPES 3D InSight (InSphero)
- Albumine de sérum bovin (BSA) (qualité RIA, faible teneur en insuline, Sigma-Aldrich, n° de cat. A7888)
- Solution de glucose, D-Glucose à 100 g/l dans H₂O (555 mM) (Sigma-Aldrich, cat. no. G8644)
- Chlorure de potassium (KCl) en poudre (Sigma-Aldrich, n° de cat. P5405)
- Solution de chlorure d'hydrogène (HCl) à 1,0 M dans de l'acide acétique (Sigma-Aldrich, n° de cat. 304174)

- Colorant d'acide nucléique fluorescent vert SYTO 13 solution à 5 mM dans du DMSO (Invitrogen, n° de cat. S7575)
- Solution d'iodure de propidium (IP) à 1,0 mg/ml dans l'eau (1,5 mM) (Invitrogen, n° de cat. P3566)

Préparations

- Solution mère KRBH 0,5% BSA. Ajouter 125 mg de BSA dans 25 ml de tampon KREBS-Ringer HEPES et agiter jusqu'à dissolution complète de la BSA. Filtrer stérilement le tampon de blocage à l'aide d'un filtre 0,2µm. Conserver à 4°C jusqu'à 2 mois. Ajouter fraîchement la quantité requise de glucose avant les expériences GSIS, comme détaillé ci-dessous.
- Solution de glucose faible (LGS) 2,8 mM. Ajouter 25 µl de solution de glucose 555 mM dans 5 ml de solution mère de KRBH.
- Solution riche en glucose (HGS) 16.7 mM. Ajouter 150 µl de solution de glucose 555 mM à 5 ml de solution mère KRBH.
- Solution de chlorure de potassium (KCl) 24 mM. Préparer la solution mère de KCl 3 M en dissolvant 223,5 mg de poudre de KCl dans 1 ml d'eau déionisée. Ajouter 16 µl de solution de KCl 3 M dans 2 ml de HGS.
- Solution d'éthanol acide 0,18 M. Ajouter 0,9 ml de solution de HCl 1,0 M dans 5 ml d'éthanol 70%.
- Solution de SYTO 13 2.5 µM. Diluer 1 µl de la solution SYTO 13 5 mM dans 2 ml de milieu.
- Solution d'IP 10 µg/ml. Diluer 20 µl de la solution d'IP 1.0 mg/ml dans 2 ml de milieu.

Protocole

1. Connecter le contrôleur en pression Flow-EZ au réseau d'air (1 bar) à l'aide du tube en polyuréthane. Connecter le contrôleur de vanne P-Switch au contrôleur en pression Flow-EZ.
2. Déposer une goutte de 20 µl de PBS à l'entrée de chaque canal pneumatique. Connecter les ports luer pneumatiques au P-Switch via les tubes de polyuréthane. Pressuriser à 1 bar toutes les vannes (V₁, V₂, V₃, V₄, V₅, V₆, V₇) jusqu'à ce que les canaux pneumatiques soient complètement remplis de PBS. Une fois que cela est fait, rouvrir toutes les vannes. Remarque : Il est important de remplir les canaux pneumatiques de liquide pour éviter l'apparition de bulles d'air dans les canaux fluidiques lors de l'actionnement des vannes.

3. Connecter la seringue de 1 ml à trois tubes TFE (waste, T1 et T2) à l'aide de connecteurs en T. Placer la seringue sur le pousse-seringue et connecter aux sorties de la puce microfluidique. Note : Faire attention à la longueur des tubes ; chaque tube doit pouvoir contenir au moins 150 μ l. Il est recommandé d'utiliser les connecteurs Fluidic 263 male luer (ChipShop, cat. no. 10000080) pour réduire la force capillaire à vaincre pendant les phases de collecte d'échantillons de bas et haut glucose qui sont effectuées à faible débit.
4. Couper l'extrémité de trois seringues en plastique de 1 ml et les insérer dans les ports d'entrée (R0, R1 et R2) de la puce microfluidique.
5. Placer la puce microfluidique dans la chambre thermostatée à 37°C avec un béccher rempli d'eau stérile pour éviter l'évaporation. Note : L'électronique peut être placé à l'extérieur de l'enceinte. Il est recommandé de scotcher les tubes sur les parois de l'enceinte une fois la configuration établie afin de ne pas perturber les flux à l'intérieur de la puce microfluidique pendant l'expérience. En particulier, il faut s'assurer que l'ouverture et la fermeture de l'enceinte ne déconnectent pas les tubes.
6. Remplissage des microcanaux fluidiques. Fermer les vannes V_3 et V_6 , les autres vannes étant ouvertes. Déposer à la pipette 150 μ l de milieu de culture dans R0, R1 et R2. Mettre en marche le pousse-seringue en mode aspiration au débit de $Q = 100 \mu\text{l}/\text{min}$ jusqu'à ce que les canaux soient remplis de liquide. Note : Le tampon PBS ou KRBH peut être utilisé à la place du milieu de culture. Il est important de fermer V_3 et V_6 pour garder les tubes de collecte intacts. Il est également important que les canaux latéraux d'entrée soient remplis de liquide pour éviter l'introduction d'une bulle d'air lors du démarrage du protocole de stimulation au glucose.
7. Piégeage de l'îlot. Fermer les vannes latérales V_1 , V_3 , V_4 , V_6 , les vannes V_2 , V_5 , V_7 étant ouvertes. Pipeter un îlot pancréatique dans 150 μ l de milieu de culture et le déposer dans le réservoir d'entrée R0. Faire fonctionner le pousse-seringue en mode aspiration au débit de $Q = 100 \mu\text{l}/\text{min}$ jusqu'à ce que l'îlot soit piégé. Remarque : Le pousse-seringue doit être actionné immédiatement après avoir déposé l'îlot dans le réservoir R0 pour éviter que l'îlot ne sédimente au fond du réservoir.

8. Phase de pré-incubation. Ne pas modifier la configuration des vannes. Ajouter 200 μl de solution bas glucose (LGS) dans R0. Faire fonctionner le pousse-seringue en mode aspiration au débit de $Q = 2,5 \mu\text{l}/\text{min}$ pendant 1 h.
9. Stimulation bas glucose. Fermer les vannes V_2, V_4, V_5, V_6 et V_7 . Ouvrir les vannes V_1 et V_3 . Le flux est maintenant dirigé de R1 à T1. Faire fonctionner le pousse-seringue en mode aspiration au débit de $Q = 2.5 \mu\text{l}/\text{min}$ pendant 1 h. Les 150 μl collectés dans T1 correspondent à l'échantillon bas glucose.
10. Stimulation haut glucose. Fermer les vannes V_1, V_2, V_3, V_5 et V_7 . Ouvrez les vannes V_4 et V_6 . Le flux est maintenant dirigé de R2 à T2. Faire fonctionner le pousse-seringue en mode aspiration au débit de $Q = 2,5 \mu\text{l}/\text{min}$ pendant 1 h. Les 150 μl recueillis dans T2 correspondent à l'échantillon haut glucose.
11. Récupération de l'îlot. Fermer les vannes V_1, V_3, V_4, V_6, V_7 . Ouvrir les vannes V_2 et V_5 . Le flux est maintenant dirigé de la poubelle à R0. Faire fonctionner le pousse-seringue en mode infusion au débit de $Q = 100 \mu\text{l}/\text{min}$ jusqu'à ce que l'îlot atteigne R0. Pipeter l'îlot dans R0 et le placer dans une plaque à puits pour une analyse plus approfondie si nécessaire. Les analyses ultérieures peuvent inclure une stimulation au KCl (1 h) et une stimulation à l'acide éthanolique (incubation pendant la nuit) pour déterminer la teneur totale en insuline, ou un test de viabilité (voir ci-dessous).

Remarque : tout le protocole étape par étape décrit ici peut être automatisé en utilisant le logiciel Automation Tool (Fluigent).

Après les incubations sur puce, les surnageants collectés ainsi que les îlots peuvent être récupérés.

12. Déconnecter la tubulure T1 de la puce microfluidique et du connecteur T. Utiliser une nouvelle seringue pour pousser le contenu de T1 vers un tube Eppendorf de 0,5 ml et conserver à -80°C . Répéter l'opération avec T2. Remarque : la déconnexion des tubes est une opération manuelle délicate et doit être effectuée aussi doucement que possible.

13. Les surnageants recueillis peuvent être utilisés pour mesurer la teneur en insuline des échantillons bas et haut glucose, en utilisant un kit commercial ELISA. Nous recommandons d'utiliser le kit ELISA de chimioluminescence de l'insuline humaine STELLUX (ALPCO, cat. no. 80-INSHU-CH01) qui permet la quantification de l'insuline avec des échantillons de 25 µl et une large gamme dynamique de 5 à 30000 pg/ml.

14. Les îlots de Langerhans récupérés peuvent être utilisés pour un test de viabilité. Incuber l'îlot avec 100 µl de solution SYTO13 2.5 µM pendant 15 min à 37°C. Ajouter 100 µl de solution d'IP 10 µg/ml et incuber pendant 5 minutes. Imager l'îlot, de préférence en utilisant la fonction z-stack sur un microscope confocal. La quantification des noyaux des cellules vivantes marquées au SYTO13 et des noyaux des cellules mortes marquées à l'IP permet alors d'évaluer la viabilité des îlots de Langerhans comme suit : viabilité (%) = (nombre de noyaux verts)/(nombre de noyaux verts + nombre de noyaux rouges)*100.

Donor 1

#	A	B	C	D	E	F
1	in well / On-chip		Concentration (µU/mL)			Stimulation Index [HG/LG]
2	Donor 1		Duplicate 1	Duplicate 2	Mean	
3	1	LG	192.51	210.89	201.7	1.520823004
4	1	HG	315.48	298.02	306.75	
5	2	LG	346.56	310.76	328.66	2.66
6	2	HG	940.77	807.89	874.33	
7	3	LG	304.84	217.89	261.365	2.71
8	3	HG	692.08	726.42	709.25	
9	4	LG	350.77	431.2	390.985	2.31
10	4	HG	837.88	965.6	901.74	
11	5	LG	321.14	319.55	320.345	2.96
12	5	HG	895.11	1002.6	948.855	
13	6	LG	356.77	328.6	342.685	1.16
14	6	HG	412.3	379.38	395.84	
15	6	KCl	1829.1	2378.1	2103.6	
16	7	Ethanol	16.113	16.113	16.113	
17	7	LG	224.61	235	229.805	2.28
18	7	HG	564.27	483	523.635	
19	7	KCl	560.2	422.82	491.51	
20	7	Ethanol	14.333	17.344	15.8385	
21	8	LG	420.28	183.65	301.965	2.487539947
22	8	HG	928.27	574.03	751.15	
23	8	KCl	285.76	188.63	237.195	
24	8	Ethanol	11.637	14.279	12.958	
25	9	LG	560.38	368.86	464.62	1.74
26	9	HG	759.95	852.45	806.2	
27	10	LG	500.46	359.94	430.2	2.62
28	10	HG	1151.9	1104	1127.95	
29	11	LG	219.11	148.37	183.74	2.91
30	11	HG	629.76	439.3	534.53	
31	12	LG	192.13	192.54	192.335	3.07
32	12	HG	628.93	551.34	590.135	
33	13	LG	127.51	102.15	114.83	4.48
34	13	HG	353.2	475.89	514.545	
35	14	LG	185.81	131.82	158.815	3.60
36	14	HG	620.34	524.15	572.245	
37	14	KCl	489.47	336.54	413.005	
38	14	Ethanol	12.351	17.359	14.855	
39	15	LG	340.25	189.75	265	1.852415094
40	15	HG	555.34	426.44	490.89	
41	15	KCl	410.35	297.99	354.17	
42	15	Ethanol	15.478	14.344	14.911	
43	16	LG	148.9	104.79	126.845	3.39
44	16	HG	494.44	364.69	429.565	
45	16	KCl	336.96	276.48	306.72	
46	16	Ethanol	14.575	18.154	16.3645	

Donor 2

	A	B	C	D	E	F
	concentration (µU/mL)					Stimulation Index (HG/LG)
Donor 2		Duplicate 1	Duplicate 2	Mean		
A9	LG	553.538	542.724	548.131	0.97	
	HG	550.503	514.094	532.2985		
	KCl	260.999	249.837	255.418		
A11	LG	298.248	279.214	288.731	1.81	
	HG	528.316	518.049	523.1825		
B7	LG	161.786	168.541	165.1635	1.48	
	HG	250.388	237.122	243.755		
	KCl	32.585	30.744	31.6645		
A12	LG	139.586	125.889	132.7375	2.12	
	HG	286.332	276.758	281.545		
	KCl	108.014	98.739	103.3765		
B2	LG	555.95	506.139	531.0445	0.77	
	HG	414.195	404.357	409.276		
B3	KCl	483.636		483.636		
	LG	93.604	101.126	97.365	1.66	
	HG	160.263	162.255	161.259		
	KCl	49.176	50.725	49.9505		

Annexe B

Code MATLAB pour le tracé des courbes expérimentales et les courbes de tendances issus de trois modèles de déformation élastiques (modèle Mooney-Rivlin, modèle Neo-Hookeen, modèle Yeoh).

```
%% Code qui permet de tracer les données expérimentales et les fits de
différents modèles élastiques

close all

%% PARTIE THEORIQUE

e0 = 164; % épaisseur de la membrane Ecoflex
r = 4600; % r = 4600 pour Chambre 6 de 200uL, r = 2430 pour Chambre 5 de
30uL, r = 2870 pour Chambre 4 de 50uL.
h = [1:1:4600];
h = h.';
V = 10^-9*(pi/3).*h.^2.*(3*r-h);
A = (r^2+h.^2)./(2*r.*h);
lambda = A.*asin(1./A);
lambdastress = lambda + 25/100; % élongation supplémentaire de 25% (pré-
contrainte dans l'assemblage)

%% MOONEY RIVLIN

C1 = -7480;
C2 = 19600;

sigmaMR1D = 2*C1.*(lambdastress.^2-1./lambdastress)+2*C2.*(lambdastress-
1./lambdastress.^2);
sigmaMR = 2*C1.*(lambdastress.^2-
1./lambdastress.^4)+2*C2.*(lambdastress.^4-1./lambdastress.^2);
PMR1D =
0.00001*1000.*((4*e0.*h)./(lambdastress.^2.*(r^2+h.^2))).*sigmaMR1D;
PMR = 0.00001*1000.*((4*e0.*h)./(lambdastress.^2.*(r^2+h.^2))).*sigmaMR;

%% NEO-HOOKEAN

CNH = 26830; % Bahrain & Mahmud

sigmaNH1D = 2*CNH.*(lambdastress.^2-1./lambdastress);
sigmaNH = 2*CNH.*(lambdastress.^2-1./lambdastress.^4);
PNH1D =
0.00001*1000.*((4*e0.*h)./(lambdastress.^2.*(r^2+h.^2))).*sigmaNH1D;
PNH = 0.00001*1000.*((4*e0.*h)./(lambdastress.^2.*(r^2+h.^2))).*sigmaNH;

%% YEOH

C1Y = 19000;
```

```

C2Y = 900;
C3Y = -4.75;

sigmaY1D = 2.*(lambdastress.^2-
1./lambdastress).*(C1Y+2*C2Y.*(lambdastress.^2+2./lambdastress-
3)+3*C3Y.*(lambdastress.^2+2./lambdastress-3).^2);
sigmaY = 2.*(lambdastress.^2-
1./lambdastress.^4).*(C1Y+2*C2Y.*(2.*lambdastress.^2+1./lambdastress.^4-
3)+3*C3Y.*(2.*lambdastress.^2+1./lambdastress.^4-3).^2);
PY1D = 0.00001*1000.*((4*e0.*h)./(lambdastress.^2.*(r^2+h.^2))).*sigmaY1D;
PY = 0.00001*1000.*((4*e0.*h)./(lambdastress.^2.*(r^2+h.^2))).*sigmaY;

```

```

%% PARTIE EXPERIMENTALE (FICHIERS .TXT P, h, V)

```

```

Pexp = phv21112018{:,1};
Vexp = phv21112018{:,3};

```

```

%% FIGURE 1D

```

```

% figure()
% %sgf1 = sgolayfilt(v,2,11);
% plot(PMR1D,V,'b-','LineWidth',2)
% hold on
% plot(PNH1D,V,'k-','LineWidth',2)
% hold on
% plot(PY1D,V,'g-','LineWidth',2)
% hold on
% plot(Pexp,Vexp,'ro','LineWidth',2)
% xlabel('Pression (mbar)')
% ylabel('Volume (uL)')
% legend('Mooney-Rivlin','Neo-Hookean','Yeoh','Experimental data')

```

```

%% FIGURE 2D

```

```

figure()
sgf1 = sgolayfilt(v,2,11);
plot(PMR,V,'b-','LineWidth',2) % Fit modèle Mooney-Rivlin
hold on
plot(PNH,V,'k-','LineWidth',2) % Fit modèle Neo-Hookean
hold on
plot(PY,V,'g-','LineWidth',2) % Fit modèle Yeoh
hold on
plot(Pexp,Vexp,'ro','LineWidth',2) % Courbe expérimentale
xlabel('Pression (mbar)')
ylabel('Volume (uL)')
legend('Mooney-Rivlin', 'Neo-Hookean', 'Yeoh','Valeurs expérimentales')

```

Bibliographie

1. Quintard, C. *et al.* Microfluidic device integrating a network of hyper-elastic valves for automated glucose stimulation and insulin secretion collection from a single pancreatic islet. *Biosens. Bioelectron.* 113967 (2022) doi:10.1016/j.bios.2022.113967.
2. Rothbauer, M., Zirath, H. & Ertl, P. Recent advances in microfluidic technologies for cell-to-cell interaction studies. *Lab. Chip* **18**, 249–270 (2018).
3. Jung Kim, M., Chul Lee, S., Pal, S., Han, E. & Myong Song, J. High-content screening of drug -induced cardiotoxicity using quantitative single cell imaging cytometry on microfluidic device. *Lab. Chip* **11**, 104–114 (2011).
4. Yang, X. *et al.* Nanofiber membrane supported lung-on-a-chip microdevice for anti-cancer drug testing. *Lab. Chip* **18**, 486–495 (2018).
5. Sayad, A. A. *et al.* A microfluidic lab-on-a-disc integrated loop mediated isothermal amplification for foodborne pathogen detection. *Sens. Actuators B Chem.* **C**, 600–609 (2016).
6. Gliberman, A. L. *et al.* Synchronized stimulation and continuous insulin sensing in a microfluidic human Islet on a Chip designed for scalable manufacturing. *Lab. Chip* **19**, 2993–3010 (2019).
7. Nourmohammadzadeh, M. *et al.* A microfluidic array for real-time live-cell imaging of human and rodent pancreatic islets. *Lab. Chip* **16**, 1466–1472 (2016).
8. Schulze, T. *et al.* A 3D microfluidic perfusion system made from glass for multiparametric analysis of stimulus-secretion coupling in pancreatic islets. *Biomed. Microdevices* **19**, 47 (2017).
9. Shaikh Mohammed, J., Wang, Y., A. Harvat, T., Oberholzer, J. & T. Eddington, D. Microfluidic device for multimodal characterization of pancreatic islets. *Lab. Chip* **9**, 97–106 (2009).
10. Xing, Y. *et al.* A pumpless microfluidic device driven by surface tension for pancreatic islet analysis. *Biomed. Microdevices* **18**, 80 (2016).
11. Bandak, B., Yi, L. & G. Roper, M. Microfluidic-enabled quantitative measurements of insulin release dynamics from single islets of Langerhans in response to 5-palmitic acid hydroxy stearic acid. *Lab. Chip* **18**, 2873–2882 (2018).
12. Dishinger, J. F., Reid, K. R. & Kennedy, R. T. Quantitative Monitoring of Insulin Secretion from Single Islets of Langerhans in Parallel on a Microfluidic Chip. *Anal. Chem.* **81**, 3119–3127 (2009).
13. Godwin, L. A. *et al.* Passively Operated Microfluidic Device for Stimulation and Secretion Sampling of Single Pancreatic Islets. *Anal. Chem.* **83**, 7166–7172 (2011).
14. Misun, P. M. *et al.* In Vitro Platform for Studying Human Insulin Release Dynamics of Single Pancreatic Islet Microtissues at High Resolution. *Adv. Biosyst.* **4**, 1900291 (2020).
15. Yi, L. *et al.* Integrated perfusion and separation systems for entrainment of insulin secretion from islets of Langerhans. *Lab. Chip* **15**, 823–832 (2015).
16. Ewart, L. & Roth, A. Opportunities and challenges with microphysiological systems: a pharma end-user perspective. *Nat. Rev. Drug Discov.* **20**, 327–328 (2021).
17. Rafael Castiello, F., Heileman, K. & Tabrizian, M. Microfluidic perfusion systems for secretion fingerprint analysis of pancreatic islets: applications, challenges and opportunities. *Lab. Chip* **16**, 409–431 (2016).
18. Munaz, A., K. Vadivelu, R., St John, J. A. & Nguyen, N.-T. A lab-on-a-chip device for investigating the fusion process of olfactory ensheathing cell spheroids. *Lab. Chip* **16**, 2946–2954 (2016).
19. Astolfi, M. *et al.* Micro-dissected tumor tissues on chip: an ex vivo method for drug testing and personalized therapy. *Lab. Chip* **16**, 312–325 (2016).
20. Ota, H., Kodama, T. & Miki, N. Rapid formation of size-controlled three dimensional hetero-cell aggregates using micro-rotation flow for spheroid study. *Biomicrofluidics* **5**, 034105 (2011).
21. Miniewicz, A., Quintard, C., Orlikowska, H. & Bartkiewicz, S. On the origin of the driving force in the Marangoni propelled gas bubble trapping mechanism. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **19**, 18695–18703 (2017).
22. Nourmohammadzadeh, M. *et al.* Microfluidic Array with Integrated Oxygenation Control for Real-Time Live-Cell Imaging: Effect of Hypoxia on Physiology of Microencapsulated Pancreatic Islets. *Anal. Chem.* **85**, 11240–11249 (2013).
23. Silva, P. N., Green, B. J., Altamentova, S. M. & Rocheleau, J. V. A microfluidic device designed to induce media flow throughout pancreatic islets while limiting shear-induced damage. *Lab. Chip* **13**, 4374–4384 (2013).

24. Ruppen, J. *et al.* A microfluidic platform for chemoresistive testing of multicellular pleural cancer spheroids. *Lab. Chip* **14**, 1198–1205 (2014).
25. Zbinden, A. *et al.* Non-invasive marker-independent high content analysis of a microphysiological human pancreas-on-a-chip model. *Matrix Biol.* **85–86**, 205–220 (2020).
26. Oh, K. W. & Ahn, C. H. A review of microvalves. *J. Micromechanics Microengineering* **16**, R13–R39 (2006).
27. Thorsen, T., Maerkl, S. J. & Quake, S. R. Microfluidic Large-Scale Integration. *Science* **298**, 580–584 (2002).
28. Zhang, M. *et al.* Highly parallel and efficient single cell mRNA sequencing with paired picoliter chambers. *Nat. Commun.* **11**, 1–13 (2020).
29. Wehner, M. *et al.* An integrated design and fabrication strategy for entirely soft, autonomous robots. *Nature* **536**, 451–455 (2016).
30. Cortese, B., Mowlem, M. C. & Morgan, H. Characterisation of an irreversible bonding process for COC–COC and COC–PDMS–COC sandwich structures and application to microvalves. *Sens. Actuators B Chem.* **160**, 1473–1480 (2011).
31. Yeoh, O. H. Some Forms of the Strain Energy Function for Rubber. *Rubber Chem. Technol.* **66**, 754–771 (1993).
32. Rodríguez-Martínez, J. A., Fernández-Sáez, J. & Zaera, R. The role of constitutive relation in the stability of hyper-elastic spherical membranes subjected to dynamic inflation. *Int. J. Eng. Sci.* **93**, 31–45 (2015).
33. Xavier, M. S., Fleming, A. J. & Yong, Y. K. Finite Element Modeling of Soft Fluidic Actuators: Overview and Recent Developments. *Adv. Intell. Syst.* **3**, 2000187 (2021).
34. Mooney, M. A Theory of Large Elastic Deformation. *J. Appl. Phys.* **11**, 582–592 (1940).
35. Rivlin, R. S. Large Elastic Deformations of Isotropic Materials. IV. Further Developments of the General Theory. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Ser. A* **241**, 379–397 (1948).
36. Martins, P., Natal Jorge, R. M. & Ferreira, A. J. M. A comparative study of several material models for prediction of hyperelastic properties: Application to silicone-rubber and soft tissues. *Strain* **42**, 135–147 (2006).
37. Quintard, C., Fouillet, Y., Parent, C., Gidrol, X. & Achard, J.-L. Expérimentation et modélisation du comportement hyperélastique d'une membrane dans une cartouche microfluidique. in *Congrès Français de Mécanique* (2019).
38. Sankar, K. S. *et al.* Culturing Pancreatic Islets in Microfluidic Flow Enhances Morphology of the Associated Endothelial Cells. *PLoS ONE* **6**, (2011).
39. Klak, M. *et al.* Bionic Organs: Shear Forces Reduce Pancreatic Islet and Mammalian Cell Viability during the Process of 3D Bioprinting. *Micromachines* **12**, 304 (2021).
40. Shintaku, H. *et al.* Effects of fluid dynamic stress on fracturing of cell-aggregated tissue during purification for islets of Langerhans transplantation. *J. Phys. Appl. Phys.* **41**, 115507 (2008).
41. Luis, E. *et al.* Silicone 3D Printing: Process Optimization, Product Biocompatibility, and Reliability of Silicone Meniscus Implants. *3D Print. Addit. Manuf.* **6**, 319–332 (2019).
42. Salvatore, G. A. *et al.* Biodegradable and Highly Deformable Temperature Sensors for the Internet of Things. *Adv. Funct. Mater.* **27**, 1702390 (2017).
43. Wang, A. *et al.* Improvement of the cytocompatibility of electrospun poly[(R)-3-hydroxybutyrate-co-(R)-3-hydroxyvalerate] mats by Ecoflex. *J. Biomed. Mater. Res. A* **100A**, 1505–1511 (2012).
44. Lablanche, S. Islet transplantation versus insulin therapy in patients with type 1 diabetes with severe hypoglycaemia or poorly controlled glycaemia after kidney transplantation (TRIMECO): a multicentre, randomised controlled trial. *Lancet Diabetes Endocrinol.* **6**, 527–537 (2018).
45. Parent, C. *et al.* Quantitative biological assays with on-chip calibration using versatile architecture and collapsible chambers. *Sens. Actuators B Chem.* **261**, 106–114 (2018).
46. Chmaysssem, A. *et al.* Development of a multiparametric (bio)sensing platform for continuous monitoring of stress metabolites. *Talanta* **229**, 122275 (2021).
47. Rambøl, M. H., Han, E. & Niklason, L. E. Microvessel Network Formation and Interactions with Pancreatic Islets in Three-Dimensional Chip Cultures. *Tissue Eng. Part A* (2019) doi:10.1089/ten.tea.2019.0186.

Chapitre 5 : Conclusions et perspectives

Chapitre 5

Chapitre 5 : Conclusions et perspectives	159
1 Perspectives d'amélioration de l'architecture en serpentin	162
1.1 Vascularisation d'îlots pancréatiques sur puce	162
1.2 Mesurer la cinétique de sécrétion d'un îlot pancréatique sur puce	164
1.3 Intégration d'un test ELISA sur puce	164
1.4 Intégration du contrôle des écoulements sur puce	165
1.5 Optimisation de la conception des vannes et simplification du banc expérimental	166
1.6 Vers de meilleures performances : mise en série des unités de piégeage	166
1.7 Modélisation du dépôt du gel dans le canal microfluidique	167
2 Perspectives plus générales pour les organoïdes-sur-puce	167
2.1 Perfusion intravasculaire.....	167
2.2 Effet de l'écoulement sur le développement des organoïdes	169
2.3 Incorporer des cellules du système immunitaire	170
2.4 Etablir des modèles de maladies.....	170
2.5 Etudier les interactions entre organes	171
Bibliographie.....	173
Annexe 1.....	174
Annexe 2.....	192

Il existe aujourd'hui un fort engouement autour des technologies d'organes-sur-puce et d'organoïdes. Très récemment a été mis en évidence le fort potentiel qui réside dans la combinaison de ces deux thématiques apparemment indépendantes. Néanmoins, de nombreux efforts sont encore nécessaires à la fois pour s'assurer de la pertinence physiologique des nouveaux dispositifs combinant ces deux technologies tout en permettant leur utilisation aisée. Cette thèse a cherché à atteindre simultanément ces deux objectifs.

Une nouvelle approche pour vasculariser de façon fonctionnelle des sphéroïdes et des organoïdes dans une puce micro fluidique a ainsi été présentée. Malgré les progrès récents dans les domaines des organes-sur-puce et des organoïdes, la vascularisation des organoïdes *in vitro* reste en effet un défi majeur (Chapitre 1). En effet, la plupart des dispositifs microfluidiques existants sont peu représentatifs de la complexité biologique et des écoulements observés *in vivo*. Compte tenu de ces contraintes, une plateforme innovante (Chapitre 2) a été développée pour établir et suivre la formation de réseaux endothéliaux autour de sphéroïdes mésenchymateux et d'organoïdes de vaisseaux sanguins générés à partir de cellules souches humaines pluripotentes induites, cultivés jusqu'à 15 jours sur puce. Ces réseaux se sont révélés fonctionnels, démontrant une perfusion intravasculaire au cœur des sphéroïdes et des organoïdes. Ce système microfluidique qui représente donc un modèle d'organoïde-sur-puce vascularisé, devrait permettre d'établir la perfusion dans divers organoïdes ou tissus biologiques (Chapitre 3).

Dans un deuxième temps, nous avons développé une plateforme microfluidique pour l'étude d'îlots pancréatiques dans une puce microfluidique intégrant des vannes permettant de facilement diriger les écoulements. Si la microfluidique a fait des progrès considérables ces dernières décennies, les dispositifs sont rarement d'une utilisation commode et ne sont pas conçus pour être industrialisés à grande échelle. En particulier, les îlots pancréatiques sont souvent étudiés à l'aide de plateformes microfluidiques dans lesquelles le contrôle des flux est généralement très limité, notamment parce que l'intégration de vannes pour diriger les écoulements est difficile à réaliser. Ici, notre puce microfluidique fabriquée en thermoplastique (COC), intègre un contrôle automatisé des écoulements pour la stimulation en glucose d'îlots pancréatiques et la récolte de l'insuline sécrétée. Le dispositif développé permet de quantifier la sécrétion d'insuline d'un seul îlot et peut être adapté à l'étude d'une grande variété de tissus biologiques et de sécrétomes.

Pour conclure ce manuscrit, il nous est paru important de présenter dans ce dernier chapitre quelques pistes de travail qu'il conviendrait de poursuivre. Ces perspectives concernent à la fois la microfluidique et la biologie.

1 Perspectives d'amélioration de l'architecture en serpentin

Dans cette section, sont proposées quelques pistes d'amélioration de l'architecture en serpentin discutée dans ce manuscrit, ainsi que différents axes de travail concernant l'étude d'îlots pancréatiques sur puce.

1.1 Vascularisation d'îlots pancréatiques sur puce

Une première perspective particulièrement intéressante serait de réunir les Chapitres 3 et 4 en proposant un modèle de test GSIS sur des îlots vascularisés. Les îlots de Langerhans sont en effet des structures hautement vascularisées *in vivo*, dont la sécrétion d'insuline est influencée par la présence de vaisseaux sanguins et par le flux à travers ceux-ci¹. Ainsi la réalisation d'un test GSIS sur des îlots pancréatiques vascularisés sur puce constituerait une avancée importante dans l'étude de la physiologie des îlots. Cela ouvrirait la voie vers des études concernant l'influence de la vascularisation des îlots sur leur fonctionnalité, ou d'autres relatives à l'incorporation de cellules du système immunitaires, qui pourraient être apportées *via* les réseaux endothéliaux induits autour des îlots.

Cette thèse, a commencé à explorer cette voie. Réunir les Chapitre 3 (vascularisation dans un hydrogel) et 4 (intégration de vannes dans le circuit microfluidique pour la réalisation d'un test GSIS) implique d'abord de valider le protocole d'injection et la mise en culture de sphéroïdes et de l'hydrogel dans les puces microfluidiques intégrant les vannes hyperélastiques. Les résultats montrent que des sphéroïdes mésenchymateux (co-culture HUVEC / fibroblastes) se différencient en des réseaux endothéliaux de la même façon que dans les puces classiques présentées au Chapitre 3 qui ne comprennent pas de membrane Ecoflex (Fig. 1). Il a également été nécessaire de vérifier le bon fonctionnement des vannes dans cette configuration. Le dépôt d'hydrogel dans le canal microfluidique ne semble pas gêner ni l'ouverture ni la fermeture des vannes, qui restent étanches aux mêmes pressions.

GFP-HUVEC, Sphéroïde mésenchymateux, Jour 5

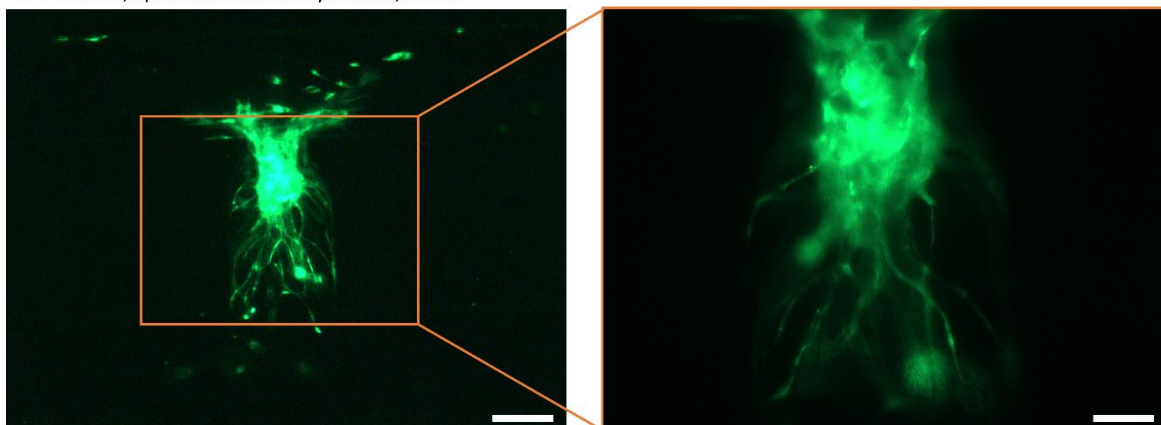


Figure 1 : Développement de structures endothéliales à partir d'un sphéroïde mésenchymateux au 5^{ème} jour de culture dans la puce microfluidique intégrant des vannes hyperélastiques. Barres d'échelle, 200 μm et 100 μm (encadré).

Une deuxième étape consiste à définir une stratégie de vascularisation d'îlots pancréatiques. Nous avons travaillé avec des îlots pancréatiques natifs issus du CHU de Montpellier. Deux approches ont été testées, en suivant le même protocole que celui décrit au Chapitre 3, 1) avec des îlots natifs (Fig. 2, en haut) et 2) avec des Langerhanoïdes (Fig. 2, en bas). Ces Langerhanoïdes ont été générés par Amandine Pitaval et Anastasia Papoz (laboratoire Biomics) en désagrégeant les îlots natifs et en les ré-agrégeant avec des cellules endothéliales (ici RFP-HUVEC) de sorte à établir un modèle d'îlot pancréatique pré-vascularisé². Dans les deux cas, les résultats sont encourageants et montrent un réseau endothélial GFP-HUVEC capable de se former et d'enlacer les îlots. Dans le cas des Langerhanoïdes, on peut deviner une potentielle anastomose entre le réseau GFP-HUVEC et les cellules endothéliales RFP-HUVEC au cœur de l'îlot (Fig. 2, en bas, encadré). Ces résultats préliminaires (n = 1) devront être reproduits et améliorés.

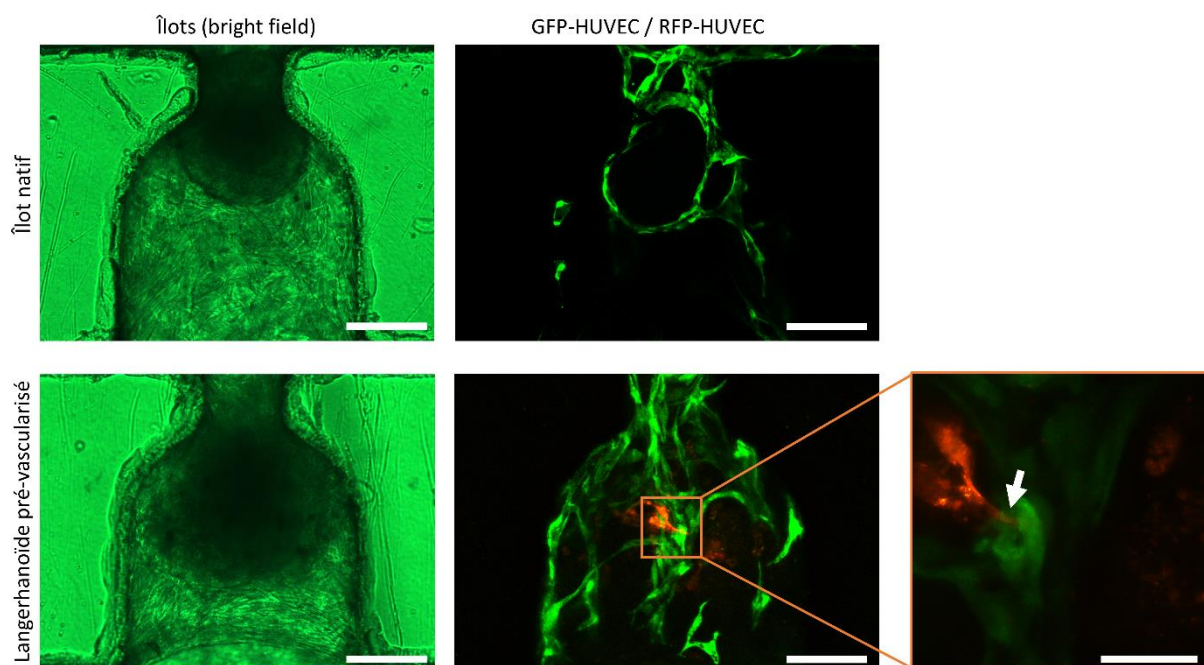


Figure 2 : Vascularisation d'îlots pancréatiques à partir d'un réseau endothélial HUVEC. Barres d'échelle, 200 μm et 100 μm (encadré).

De nombreuses difficultés se manifestent néanmoins pour atteindre cet objectif. La mise en culture sur le long terme dans la puce intégrant les vannes pneumatiques est délicate. En effet, le banc expérimental est complexe, faisant à la fois intervenir un réseau d'air, une partie électronique pour l'actionnement des vannes, et un environnement humide (incubateur classique) pour la mise en culture. De plus, pendant toute la durée de l'expérience, il faut veiller à ne pas introduire de bulles d'air dans le circuit, alors qu'une observation régulière de la puce sous microscope nécessite de débrancher et rebrancher différentes connectiques à de nombreuses reprises. Enfin, la membrane Ecoflex est légèrement opaque et réduit quelque peu

la qualité de l'imagerie (Fig. 1). Ainsi, il n'est pas possible d'imager la puce au microscope confocal dans sa version actuelle. Malheureusement ces actions n'ont pu être menées dans le cadre de la thèse par manque de temps. Cependant, ces difficultés technologiques ne semblent pas insurmontables et pourront être réalisées dans le futur.

1.2 Mesurer la cinétique de sécrétion d'un îlot pancréatique sur puce

Un autre objectif consiste à modifier le dispositif présenté au Chapitre 4 afin de pouvoir mesurer la cinétique de sécrétion d'un îlot pancréatique. En effet, dans le système présenté, les sécrétions de l'îlot sont recueillies dans des tubes de sortie après 1 h de perfusion microfluidique. Il serait intéressant, à la manière de Misun et al.³, d'envisager la récolte des sécrétions de l'îlot suivant des intervalles de temps beaucoup plus courts (par exemple toutes les 5 min). Chaque échantillon serait alors dosé pour déterminer son contenu en insuline et la courbe de sécrétion d'un îlot au cours du temps pourrait ainsi être tracée.

Une telle modification nécessite de repenser quelque peu notre système actuel. On pourrait par exemple envisager de placer le pousse-seringue en entrée du circuit afin de pousser les différents liquides vers des puits de sorties. Le contenu de chaque puits serait alors pipeté régulièrement pour une quantification ultérieure. Des problèmes liés aux limites de sensibilités des kits ELISA devront être anticipés.

1.3 Intégration d'un test ELISA sur puce

Enfin, une quantification *in situ* de l'insuline sécrétée répondrait parfaitement aux objectifs d'automatisation et d'intégration des dispositifs microfluidiques. Un test GSIS complet, de la stimulation en glucose jusqu'à la mesure de l'insuline sécrétée, pourrait ainsi être réalisé au sein d'un même dispositif microfluidique.

Au laboratoire, nous avons déjà travaillé sur la faisabilité d'un test ELISA sur puce microfluidique de façon automatisée⁴. Fondée sur la même technologie de membrane hyperélastique que celle sur laquelle repose notre système microfluidique présenté au Chapitre 4, la réunion de ces deux approches au sein d'un nouveau dispositif serait particulièrement bienvenue (Fig. 3). Dans ce sens, des actions en cours de montage au laboratoire concernent le couplage du circuit en serpentin à des capteurs optiques et massiques. Une des questions concerne aussi l'aliquotage automatisé des sécrétions vers des puits spécifiques.

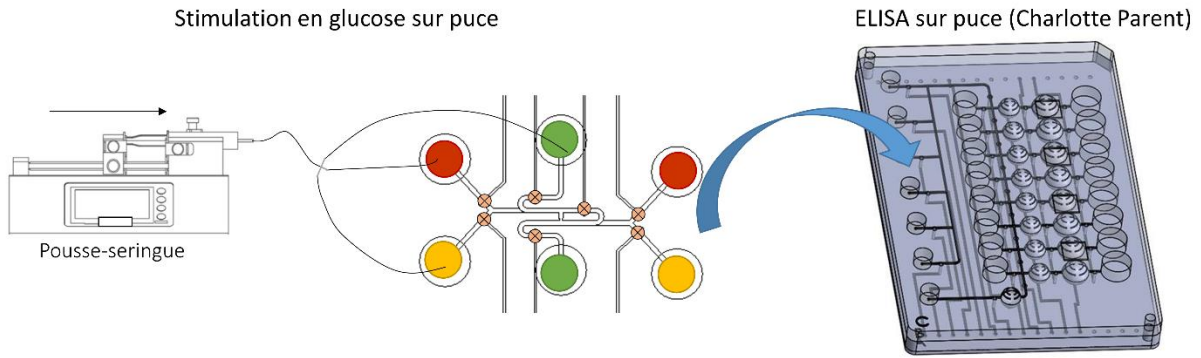


Figure 3 : Représentation schématique d'une perspective d'intégration de la mesure de l'insuline *in situ*.

1.4 Intégration du contrôle des écoulements sur puce

De manière générale dans ce travail de thèse, nous avons choisi de contrôler les écoulements à l'aide d'un pousse-seringue. Un inconvénient du pousse-seringue est son encombrement. En vue d'une intégration des systèmes microfluidiques, il serait intéressant de pouvoir générer les écoulements directement au sein du composant microfluidique, grâce à l'intégration d'une micro-pompe péristaltique sur puce.

Des telles micro-pompes ont déjà été réalisées au laboratoire⁵. Selon un principe de fonctionnement fondé sur la déformation d'une membrane hyperélastique, un volume de liquide est déplacé de proche en proche en activant un cycle d'ouverture et de fermeture de trois microchambres placées en série (Fig. 4). Une large gamme de débits est accessible grâce à cette approche, en fonction de la taille des chambres choisie pour une application donnée.

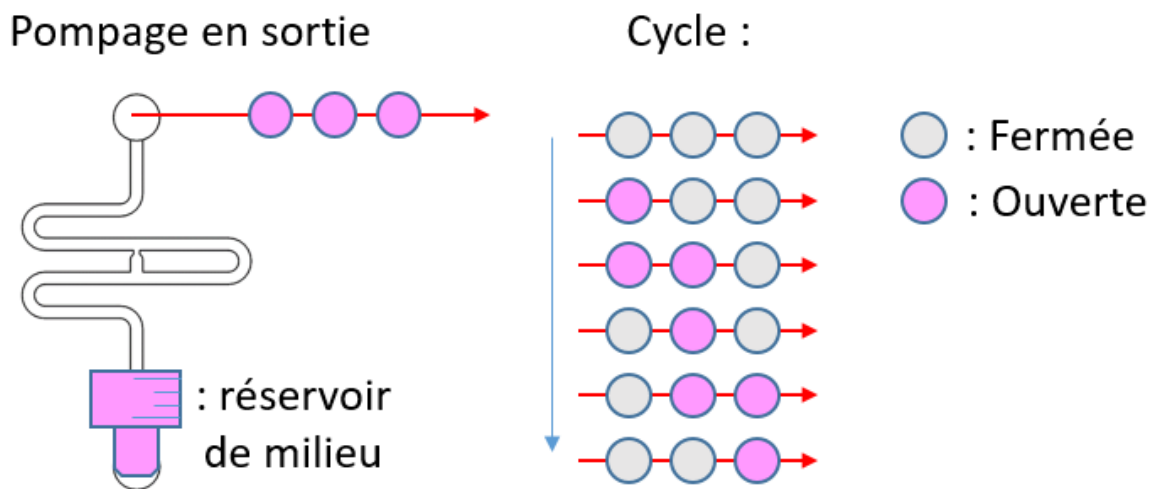


Figure 4 : Schéma de principe de fonctionnement d'une pompe péristaltique sur puce.

1.5 Optimisation de la conception des vannes et simplification du banc expérimental

Comme déjà évoqué au Chapitre 4, Il est apparu nécessaire d’optimiser les vannes pour assurer leur étanchéité dès la première utilisation ; une telle démarche en ce sens est en cours au laboratoire.

Par ailleurs, le banc expérimental de la puce microfluidique dédiée aux tests GSIS est à l’heure actuelle peu commode. En particulier, les connectiques pneumatiques sont encombrantes. Il serait ainsi intéressant de pouvoir activer les canaux pneumatiques *via* un bloc d’électrovannes compact comme cela est courant au laboratoire⁶.

1.6 Vers de meilleures performances : mise en série des unités de piégeage

Comme cela a déjà été mentionné dans ce manuscrit, l’architecture en serpentín présentée est bien adaptée pour permettre l’amélioration des performances des systèmes d’organes-sur-puce. Les pièges hydrodynamiques peuvent être multipliés au sein d’un même circuit microfluidique, soit en les alignant le long d’une même portion rectiligne du canal serpentín, soit en augmentant le nombre de boucles du circuit (Fig. 5a), soit en combinant les deux solutions (Fig. 5b). Dans ce dernier cas, il faut veiller à satisfaire certaines conditions sur les débits pour s’assurer qu’un sphéroïde et un seul se retrouve piégé dans chacun des bippasses. Zbinden et al.⁷ ont récemment fourni une analyse détaillée de leur dispositif reposant sur cette architecture permettant de piéger $4 \times 8 = 32$ îlots pancréatiques.

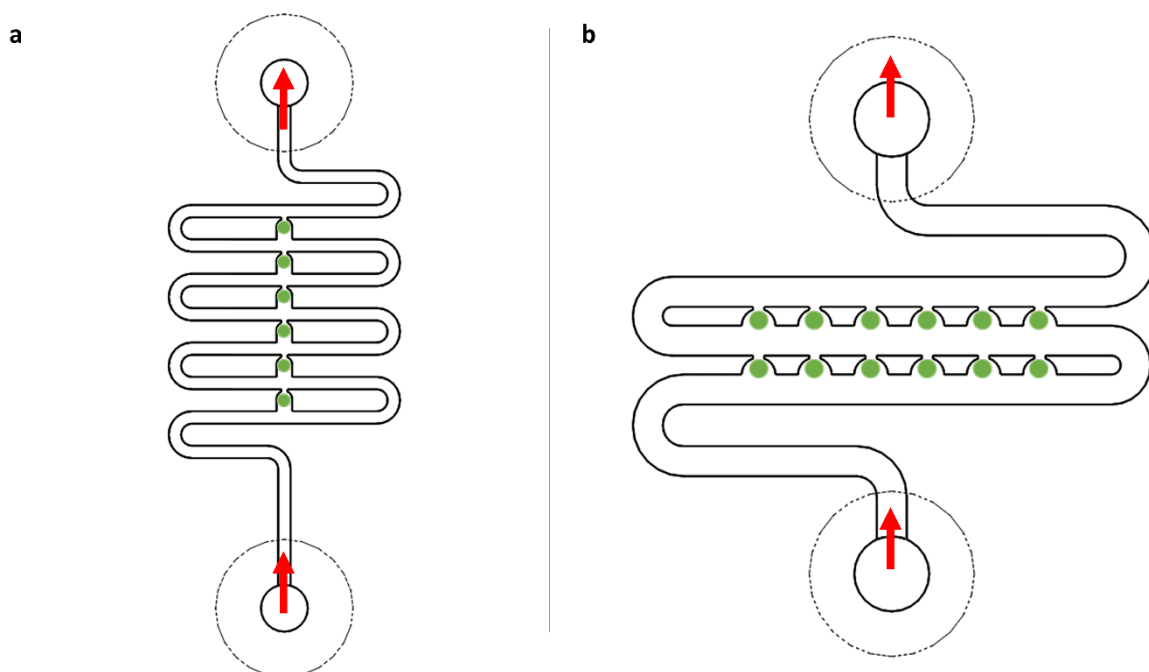


Figure 5 : Mise en série des unités de piégeage dans l’architecture en serpentín. **a.** En augmentant le nombre de boucles du canal (1 piège par boucle), **b.** En alignant plusieurs pièges (6 ici) sur plusieurs portions rectilignes du canal (2 ici).

1.7 Modélisation du dépôt du gel dans le canal microfluidique

Enfin, la modélisation du dépôt de l'hydrogel dans les coins et sur les parois du canal microfluidique, résultant du protocole d'injection détaillé au Chapitre 2, mériterait d'être approfondie. D'abord, il serait souhaitable de mieux contrôler le manchon d'hydrogel laissé par le passage du doigt d'air, pour une meilleure endothélialisation du canal. A l'heure actuelle en effet, le dépôt d'hydrogel se fait majoritairement dans les coins du canal à section carrée. En jouant sur la viscosité de l'hydrogel, la vitesse d'injection du doigt d'air ou la forme du canal, il devrait être possible de former un manchon cylindrique de diamètre contrôlé, de façon à mieux reproduire la physiologie du système vasculaire humain. Un travail expérimental supplémentaire devra alors valider cette possibilité.

De plus, la forme courbe de l'interface gel-air au niveau du piège laissée par le passage du doigt d'air n'a pas été étudiée. Afin d'encapsuler les organoïdes d'une façon robuste et contrôlée, il serait pourtant nécessaire de comprendre les phénomènes physiques régissant cette encapsulation.

2 Perspectives plus générales pour les organoïdes-sur-puce

Dans cette section, la discussion sera élargie aux systèmes d'organoïdes-sur-puce plus globalement, tout en s'appuyant sur les travaux présentés au Chapitre 3.

2.1 Perfusion intravasculaire

Au Chapitre 3, la perfusion intravasculaire d'organoïdes vascularisés au sein d'une puce microfluidique a été démontrée. Cette perfusion au cœur des organoïdes de vaisseaux sanguins (Blood Vessel Organoids, BVO) a été rendu possible par la formation d'un réseau endothélial constitué de cellules HUVEC autour des organoïdes et capables de se connecter à ces derniers. Cependant, ces connexions semblent rares et fragiles, si bien qu'il a été relativement compliqué d'observer la perfusion de microbilles dans les vaisseaux des organoïdes. En effet, les HUVEC n'intègrent pas toute la complexité physiologique des vaisseaux sanguins, et leur faible potentiel d'anastomose a déjà été mis en évidence dans des expériences d'implantation *in vivo*⁸. Remplacer les HUVEC par d'autres cellules endothéliales, par exemple des cellules endothéliales dérivées de cellules souches (iPS cell-derived ECs) pourrait s'avérer une stratégie gagnante⁹.

Une autre approche consisterait à cultiver les organoïdes de vaisseaux sanguins, seuls dans l'hydrogel, et à attendre que des connexions ouvertes, issues des bourgeonnements en périphérie des organoïdes, se créent spontanément entre les canaux microfluidiques et les vaisseaux des organoïdes. Nous avons observé ce phénomène dans des circuits où le réseau HUVEC s'était mal développé (Fig. 6).

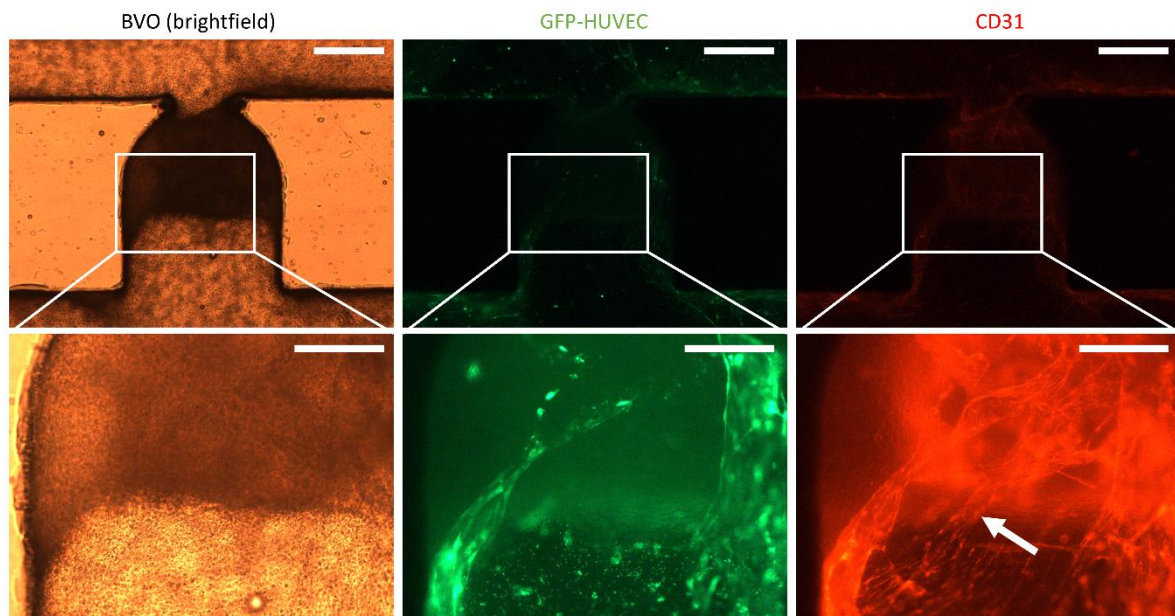


Figure 6 : BVO-sur-puce au 12^{ème} jour de culture, circuit pour lequel le réseau GFP-HUVEC ne s'est pas convenablement développé. La flèche blanche indique un vaisseau de l'organoïde formant une connexion ouverte avec le canal serpentin. Barres d'échelle, 200 μm et 100 μm (encadrés).

Dans cette configuration, une solution de PBS fortement concentrée en microbilles fluorescentes vertes (1 μm de diamètre) a été perfusée après immunomarquage comme décrit au Chapitre 3. La circulation de plusieurs microbilles (Fig. 7) dans le vaisseau de l'organoïde mis en évidence en Fig. 6 a été observée. La structure en tube creux du vaisseau considéré a bien été confirmée par une imagerie au microscope confocal (encadré dans la Fig. 7). Ces résultats préliminaires ($n = 1$) sont à reproduire.

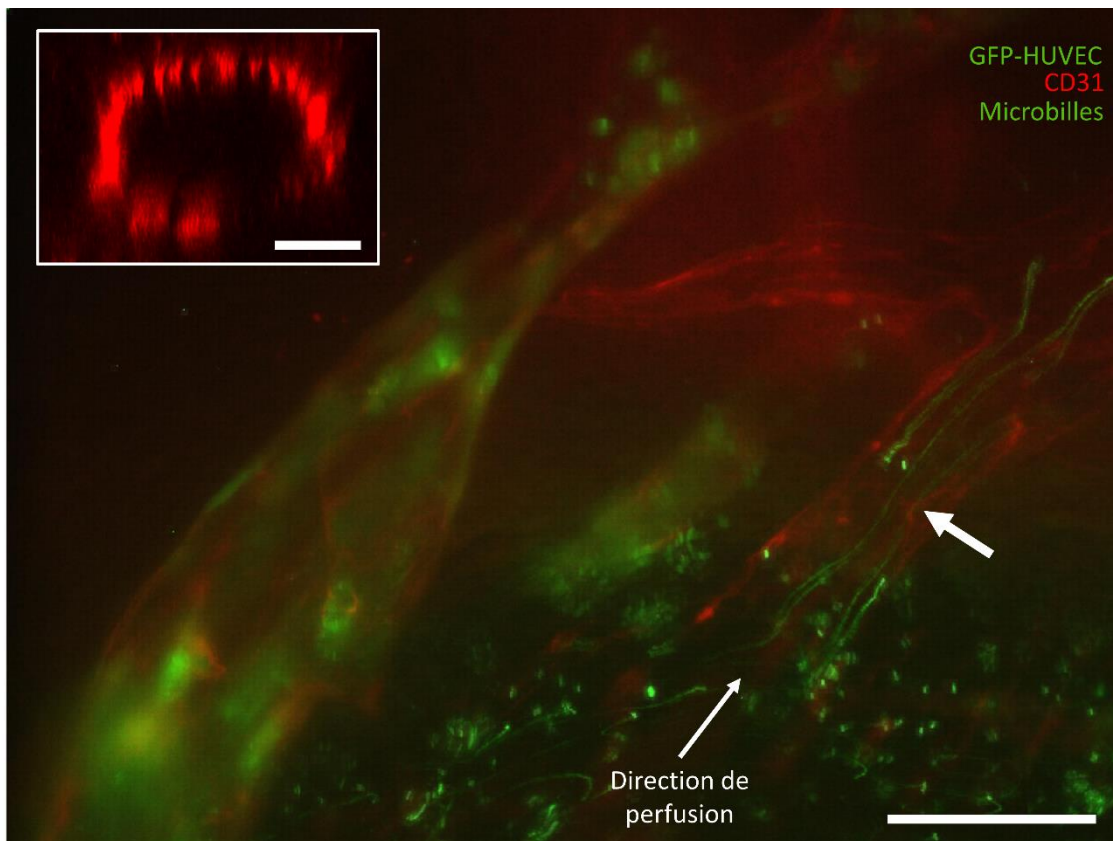


Figure 7 : Perfusion d'un vaisseau de l'organoïde par des microbilles fluorescentes. La flèche blanche montre les microbilles fluorescentes vertes circulant dans le vaisseau de l'organoïde. L'encadré montre une vue orthogonale du vaisseau (microscope confocal, grossissement x63) où la structure en lumière creuse du vaisseau est mise en évidence. Barres d'échelle, 50 μm et 10 μm (encadré).

La possibilité de perfuser ces organoïdes de vaisseaux sanguins, et plus généralement tout organoïde pré-vascularisé, peut être considéré comme le point de départ de nombreuses pistes de recherches qui vont brièvement être évoqués dans les prochaines sections.

2.2 Effet de l'écoulement sur le développement des organoïdes

Quelques études récentes ont montré le rôle prédominant que joue l'écoulement dans la maturation des organoïdes¹⁰⁻¹⁴. Homan et al.¹² ont par exemple montré que la maturation et la vascularisation d'organoïdes de rein étaient fortement améliorées lorsque ceux-là étaient soumis à un écoulement dynamique par rapport aux conditions statiques classiques (Fig. 8a). L'approche présentée dans ce manuscrit pourrait également permettre des études concernant le rôle du flux sur la maturation et le développement des organoïdes, par exemple en changeant légèrement la géométrie des sites de piégeage (Fig. 8b). Par exemple, le fait d'encapsuler partiellement les organoïdes dans l'hydrogel permet d'appliquer aux organoïdes une contrainte de cisaillement induite par l'écoulement de façon plus directe.

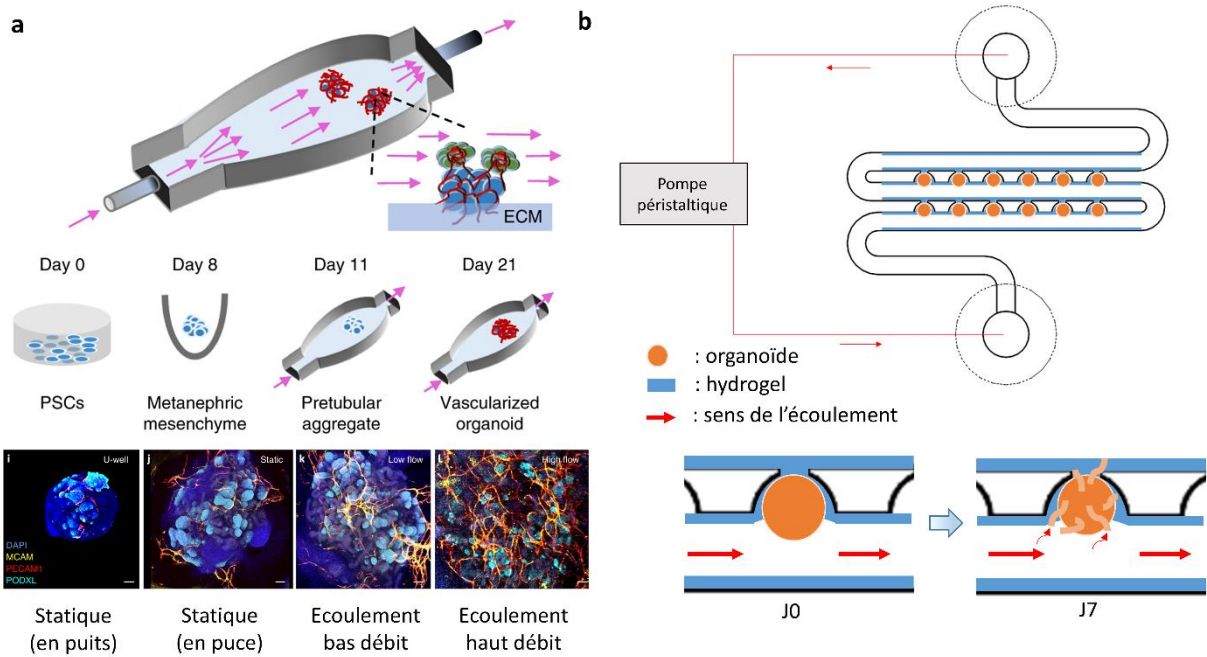


Figure 8 : **a.** Etude de l'effet de l'écoulement sur la maturation et la vascularisation d'organoïdes de rein par Homan et al.¹². En conditions d'écoulement, la vascularisation des organoïdes (filaments orange) est largement améliorée par rapport aux conditions statiques. **b.** Perspectives d'évolution de l'architecture en serpentin pour l'étude de l'influence de l'écoulement sur le développement des organoïdes.

2.3 Incorporer des cellules du système immunitaire

Le système immunitaire joue un rôle primordial dans de nombreux processus biologiques impliqués dans des pathologies aussi variées que les maladies inflammatoires, les cancers, les maladies auto-immunes etc. Les organoïdes produits à partir de cellules souches représentent d'excellents modèles biologiques, intégrant un degré de complexité élevé. Néanmoins, les organoïdes présentent encore plusieurs limitations, notamment l'absence de composants immunitaires. Dans des organoïdes-sur-puce vascularisés de façon fonctionnelle comme présentés dans ce manuscrit, des cellules du système immunitaire pourraient être délivrées au sein des organoïdes. Les processus d'adhérence ou de migration de ces cellules dans les réseaux vasculaires formés pourraient alors être reproduits et observés dans les puces microfluidiques.

2.4 Etablir des modèles de maladies

Les organes-sur-puce et *a fortiori* les organoïdes-sur-puce peuvent également être de bons modèles de maladies (Chapitre 1), notamment lorsque les modèles animaux n'existent pas. Dans notre cas, il serait particulièrement intéressant d'étudier le développement de certaines maladies touchant les vaisseaux sanguins. Par exemple, la maladie CADASIL (pour Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy en

anglais) est une maladie génétique touchant les petits vaisseaux sanguins au niveau du cerveau, dans laquelle le flux sanguin joue un rôle primordial¹⁵. Ainsi, l'étude de l'effet de l'écoulement dans des organoïdes de vaisseaux sanguins produits à partir de cellules de patients CADASIL constitue une perspective de travail possible. Un autre exemple concerne l'athérosclérose, maladie touchant les artères de gros et moyen calibre et caractérisée par l'apparition de plaques d'athérome. Là encore, il est établi que la contrainte de cisaillement imposée par le flux sanguin régule l'athérosclérose en modifiant la physiologie des cellules endothéliales. Engendrer des organoïdes de plus gros vaisseaux sanguins, perfusables grâce à la microfluidique, pourrait permettre d'établir un modèle pertinent de la maladie. Enfin, faire circuler un milieu de culture mimant l'hyperglycémie dans les organoïdes de vaisseaux sanguins devrait conduire à un bon modèle de la vasculopathie diabétique, comme cela a été initialement montré en régime statique et *in vivo* avec ces organoïdes¹⁶.

2.5 Etudier les interactions entre organes

Enfin, en ce qui concerne l'étude des interactions entre organes¹⁷⁻¹⁹, les organes-sur-puce et organoïdes-sur-puce possèdent un potentiel certain. L'architecture en serpentins couplée au procédé d'injection présentée au Chapitre 2 convient à la réalisation de cet objectif. Nous avons par exemple montré la culture de 6 sphéroïdes mésenchymateux. Après quelques jours de culture, ces sphéroïdes ont été capables de proliférer et semblent se connecter les uns aux autres *via* des structures endothéliales (Fig. 9a). Plus généralement, on pourrait imaginer connecter deux circuits microfluidiques contenant deux populations d'organoïdes différentes afin d'étudier, par exemple, l'effet des sécrétions du premier type d'organoïdes sur le second (Fig. 9b). Cette démarche s'inscrit dans un cadre plus général encore, qui s'intéresse au développement de « corps humain sur puce » où de nombreux organes du corps humain pourraient être interconnectés et les interactions entre eux étudiées²⁰ (Fig. 9c).

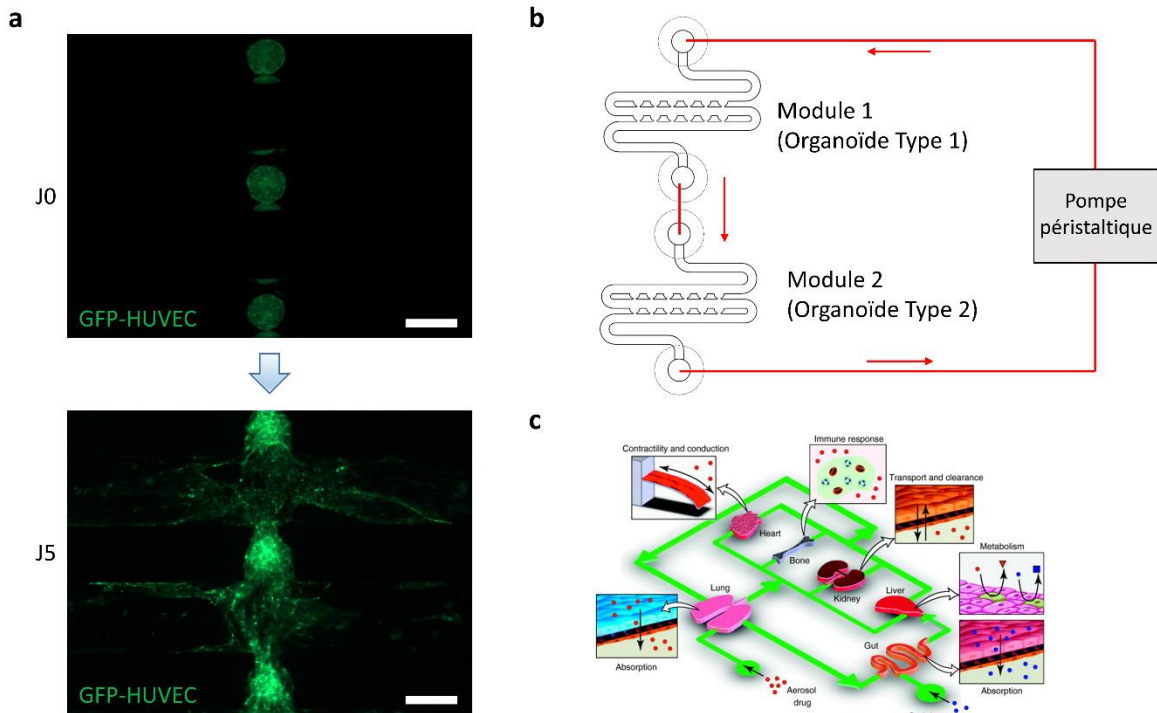


Figure 9 : **a.** Mise en culture de 6 sphéroïdes mésenchymateux en série (seuls 3 sphéroïdes sont visibles sur ces photographies). Initialement (J0, juste après le passage du doigt d'air pour encapsuler les sphéroïdes), les sphéroïdes sont piégés dans les bipses du circuit en serpentin. Après quelques jours de culture, les sphéroïdes ont proliféré et semblent interagir les uns avec les autres, **b.** Représentation schématique d'une plateforme multi-organoïdes-sur-puce, **c.** Représentation schématique de l'objectif de « corps humain sur puce », tiré de Huh et al.²⁰. Barres d'échelle, 400 μm .

Bibliographie

1. Muratore, M., Santos, C. & Rorsman, P. The vascular architecture of the pancreatic islets: A homage to August Krogh. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* **252**, 110846 (2021).
2. Papoz, A. *et al.* Les Langerhanoïdes, des organoïdes d'îlots pancréatiques. *médecine/sciences* **38**, 52–58 (2022).
3. Misun, P. M. *et al.* In Vitro Platform for Studying Human Insulin Release Dynamics of Single Pancreatic Islet Microtissues at High Resolution. *Adv. Biosyst.* **4**, 1900291 (2020).
4. Parent, C. *et al.* Quantitative biological assays with on-chip calibration using versatile architecture and collapsible chambers. *Sens. Actuators B Chem.* **261**, 106–114 (2018).
5. Fouillet, Y. *et al.* Stretchable Material for Microfluidic Applications. *Proceedings* **1**, 501 (2017).
6. Parent, C. *Développement d'une plateforme autonome et portable et pour des applications santé.* (Université Grenoble Alpes (ComUE), 2018).
7. Zbinden, A. *et al.* Non-invasive marker-independent high content analysis of a microphysiological human pancreas-on-a-chip model. *Matrix Biol.* **85–86**, 205–220 (2020).
8. Chen, X. *et al.* Rapid Anastomosis of Endothelial Progenitor Cell–Derived Vessels with Host Vasculature Is Promoted by a High Density of Cotransplanted Fibroblasts. *Tissue Eng. Part A* **16**, 585–594 (2009).
9. Vila Cuenca, M. *et al.* Engineered 3D vessel-on-chip using hiPSC-derived endothelial- and vascular smooth muscle cells. *Stem Cell Rep.* **16**, 2159–2168 (2021).
10. Berger, E. *et al.* Millifluidic culture improves human midbrain organoid vitality and differentiation. *Lab. Chip* **18**, 3172–3183 (2018).
11. Cho, A.-N. *et al.* Microfluidic device with brain extracellular matrix promotes structural and functional maturation of human brain organoids. *Nat. Commun.* **12**, 1–23 (2021).
12. Homan, K. A. *et al.* Flow-enhanced vascularization and maturation of kidney organoids in vitro. *Nat. Methods* **16**, 255–262 (2019).
13. Jin, Y. *et al.* Vascularized Liver Organoids Generated Using Induced Hepatic Tissue and Dynamic Liver-Specific Microenvironment as a Drug Testing Platform. *Adv. Funct. Mater.* **28**, 1801954 (2018).
14. Kug Lee, K. *et al.* Human stomach-on-a-chip with luminal flow and peristaltic-like motility. *Lab. Chip* **18**, 3079–3085 (2018).
15. Yin, X., Zhou, Y., Yan, S. & Lou, M. Effects of Cerebral Blood Flow and White Matter Integrity on Cognition in CADASIL Patients. *Front. Psychiatry* **0**, (2019).
16. Wimmer, R. A. *et al.* Human blood vessel organoids as a model of diabetic vasculopathy. *Nature* **565**, 505–510 (2019).
17. Koike, H. *et al.* Modelling human hepato-biliary-pancreatic organogenesis from the foregut–midgut boundary. *Nature* **574**, 112–116 (2019).
18. Skardal, A. *et al.* Multi-tissue interactions in an integrated three-tissue organ-on-a-chip platform. *Sci. Rep.* **7**, 1–16 (2017).
19. Osaki, T., Sivathanu, V. & Kamm, R. D. Engineered 3D vascular and neuronal networks in a microfluidic platform. *Sci. Rep.* **8**, 1–13 (2018).
20. Huh, D., Hamilton, G. A. & Ingber, D. E. From 3D cell culture to organs-on-chips. *Trends Cell Biol.* **21**, 745–754 (2011).

An automated microfluidic platform integrating functional vascularized organoids-on-chip

Clément Quintard^{1,2*}, Gustav Jonsson^{3,4}, Camille Laporte^{1,2}, Caroline Bissardon¹, Amandine Pitaval², Nicolas Werschler⁵, Alexandra Leopoldi³, Astrid Hagelkrüys³, Pierre Blandin¹, Jean-Luc Achard⁶, Fabrice Navarro¹, Yves Fouillet^{1*}, Josef M. Penninger^{3,5}, Xavier Gidrol^{2*}

¹ Univ. Grenoble Alpes, CEA, LETI, DTBS, 38000 Grenoble, France

² Univ. Grenoble Alpes, CEA, IRIG, BIOMICS, 38000 Grenoble, France

³ Institute of Molecular Biotechnology of the Austrian Academy of Sciences, Dr. Bohr-Gasse 3, 1030 Vienna, Austria

⁴ Vienna BioCenter PhD Program, Doctoral School of the University of Vienna and Medical University of Vienna, A-1030, Vienna, Austria

⁵ Department of Medical genetics, Life Sciences Institute, University of British Columbia, Canada

⁶ CNRS, LEGI, F-38000 Grenoble, France

*E-mail: clement.quintard@cea.fr; josef.penninger@ubc.ca; xavier.gidrol@cea.fr

Abstract

The development of vascular networks on-chip is crucial for the long-term culture of three-dimensional cell aggregates such as organoids, spheroids, tumoroids, and tissue explants. Despite the rapid advancement of microvascular network systems and organoid technology, vascularizing organoids-on-chips remains a challenge in tissue engineering. Moreover, most existing microfluidic devices poorly reflect the complexity of *in vivo* flows and require complex technical settings to operate. Considering these constraints, we developed an innovative platform to establish and monitor the formation of endothelial networks around model spheroids of mesenchymal and endothelial cells as well as blood vessel organoids generated from pluripotent stem cells, cultured for up to 15 days on-chip. Importantly, these networks were functional, demonstrating intravascular perfusion within the spheroids or vascular organoids connected to neighbouring endothelial beds. This microphysiological system thus represents a viable organ-on-chip model to vascularize biological tissues and should allow to establish perfusion into organoids using advanced microfluidics.

Introduction

The ability to vascularize organoids remains a challenge in the field of tissue engineering. Indeed, most tissues exceeding 400 μm in thickness need a functional vasculature to ensure a sufficient supply of nutrients and oxygen, as well as the ability to remove carbon dioxide and cellular waste products, preventing the formation of necrotic inner cores¹. While several approaches have been used to engineer microvascular networks on-chip, the self-organization of endothelial cells is a preferred way because it closely mimics *in vivo* vasculogenesis and angiogenesis processes². Self-organization can be achieved by seeding endothelial cells and supportive cells in a hydrogel, providing structural matrix and biochemical support to the embedded cells³. Much progress has been made in generating perfusable vascular networks on a chip, either as a tissue on its own⁴⁻⁶, or by incorporating spheroids such as micro-tumours or pancreatic islets⁷⁻¹¹. Compared to spheroids, organoids offer the advantage of recapitulating complex 3D organ-specific structure and function. However, they are usually cultured under static conditions where they lack vasculature. Recently, significant efforts have been devoted to the development of vascularized complex organoids *in vitro*^{12,13}. However, to the best of our knowledge, no *in vitro* system has shown intravascular perfusion within organoids through functional anastomosis with a neighbouring endothelial network.

Current microfluidic chip designs primarily consist of a central microchamber, bound by two lateral perfusion microchannels. The cell-containing gel is pipetted into the central microchamber, and micropatterned ridges or posts have to be engineered to prevent leakage in the perfusion channels¹⁴⁻¹⁶. Capillary burst valves have been designed, based on geometric logic, to prevent such leakage^{17,18}. However, since fluid handling in such designs is delicate, special and technically challenging loading techniques are often required to slow down the polymerisation of the hydrogels¹⁹⁻²¹. Most chip designs also do not provide an automated trapping mechanism of the biological object of interest. For instance, Nashimoto et al.²⁰ manually placed a model spheroid into a specific well, micromachined in a chip. Phan et al.²² placed micro-organs and micro-tumours in a microvascular network chip but failed to precisely control their location.

Organ-on-chip technologies have emerged over the last decade with great promise. They are powerful tools to assess basic mechanisms of physiology and disease, improved toxicity testing and screening of new drugs²³. However, it has become clear that significant efforts are needed to provide robust and accessible ways to generate vascularized organs- and organoids-on-chip^{24,25}. Here, we report an innovative organ-on-chip device based on a serpentine microchannel architecture that allows for automated and precise location of spheroids or organoids. The reliability of our system was validated using spheroids generated from fibroblasts and endothelial cells as well as 3D human blood vessel organoids generated from human-induced pluripotent stem cells (iPSCs)²⁶. Importantly, we demonstrate effective anastomosis and controlled perfusion of the vascular organoids providing a method for organ-on-chip vascularization that can be adapted to a multitude of other 3D cell aggregates; such as organoids, tumoroids, spheroids, or tissue explants.

Results

Design of a serpentine-shaped microfluidic device for precise entrapment of organoids.

We set out to design a microfluidic device that is user-friendly, robust and automated. A microfluidic chip was fabricated using Cyclic Olefin Copolymer (COC), a material that offers long-term robustness, is suitable for mass production, has desired optical qualities for imaging, and low attachment of chemicals²⁷. The microchannel architecture allowed us to precisely and reproducibly trap an organoid to a predefined location consisting of a U-cup shaped restriction (Fig 1. a,b). The chip was designed based on existing hydrodynamic trapping principles²⁸, but with some modifications in consideration of the organoids' diameters and loading processes (Supplementary Figs. 1,2 and Supplementary Note 1).

Microfluidic trapping through differential hydrodynamic resistance has been proven to be highly efficient^{29,30} and generates low shear stress in the U-cup trap once it is occupied^{31,32}. The organoid, embedded in a fibrin hydrogel, was precisely positioned in the trap site without any apparent morphological alteration (Supplementary Fig. 3). After the trapping of the organoid and surrounding endothelial cells, air was injected to push the hydrogel toward the exit of the microfluidic channel. After hydrogel polymerization, the continuous microfluidic perfusion with growth medium was established (Fig. 1c). Both the hydrogel and the air were injected at $Q = 300 \mu\text{l}/\text{min}$. Of note, the hydrogel remained inside the trap site due to capillarity, effectively surrounding the organoid, and minimizing organoid contact with the microchannel walls resulting in a permanent organoid encapsulation inside the trap site³³. Because of the Landau-Levich-Bretherton effect³⁴, a thin layer of hydrogel also remained along the square profile cross-section of the microchannels after injection of air (Fig. 1d). We used this property as a way to provide endothelialization of the serpentine channel with human umbilical vein endothelial cells (HUVEC). Experiments using an adapted in-house light sheet fluorescence microscopy set-up were conducted to observe the three-dimensional structure of the hydrogel deposition near the trap site and along the main serpentine microchannel (Fig. 1e and Supplementary Fig. 4). Thus, we have designed a serpentine geometry chip for precise and controlled entrapment of organoids in endothelialized channels.

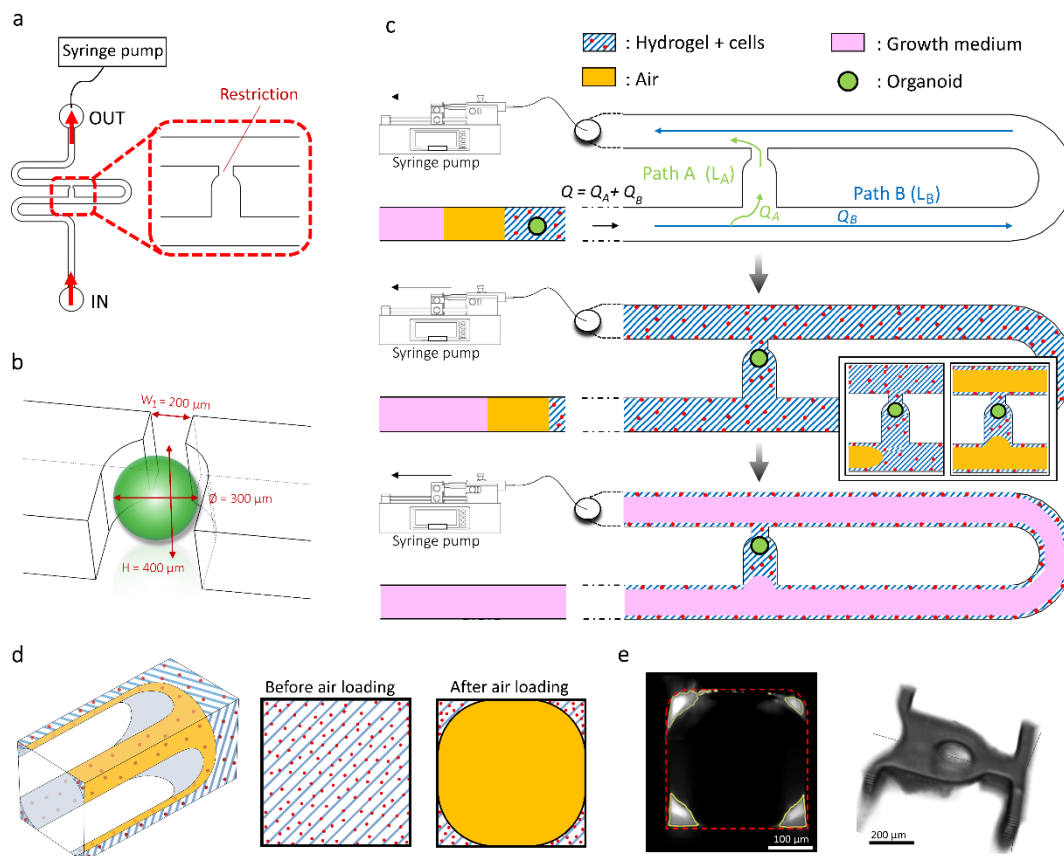


Fig. 1. Device design and overview of organoid and cell configurations. **a**, Top view of the microfluidic device. A syringe pump was connected to the outlet of the channel to introduce fluids perfusion. **b**, Schematic three-dimensional view of the U-cup shaped area functioning as a trap. Here, the trap site is exemplary occupied by a cell aggregate of 300 μm in diameter. **c**, Schematic diagram showing an overview of the loading process. Initially, the hydrogel containing an organoid and HUVEC cells was introduced. Before polymerization of the hydrogel, air was introduced to position the hydrogel and the HUVEC cells. Finally, growth medium was introduced for continuous perfusion of the microfluidic chamber and trapped organoid. **d**, Schematic 3D and cross-sectional views of the microchannel showing the air loading process and associated hydrogel deposition. **e**, Experimental cross-sectional view (left) of the microfluidic channel showing the hydrogel deposition in the trap and in the channel's corners and 3D rendering (right), taken with an in-house light sheet fluorescence microscopy set-up.

Establishment of interconnected endothelial networks

To interrogate the usefulness and biological relevance of our design, we set out to develop endothelial networks in the newly designed microfluidic chips. We used cell aggregates consisting of fibroblasts and GFP (green) labelled HUVEC cells, termed here mesenchymal spheroids, which were seeded into the microfluidic channels. We first examined the effects of fluid flow on the differentiation of these spheroids into vessel-like structures by culturing them alone under static (with media change every day) or flow conditions (Fig. 2a). We observed an enhanced formation of endothelial networks under dynamic perfusion, with a significant 4.4-, 5.0-, 4.8- and 6.5-fold increase in the number of junctions, number of segments, total segment length and number of meshes respectively, as compared to static conditions (Fig. 2b).

Since the hydrogel in the microchannels contains HUVEC cells, we sought to establish connections between the HUVEC seeded serpentine microchannel and the trapped mesenchymal

spheroids. The HUVEC endothelial cells of the spheroids expressed GFP (green) and the HUVEC endothelial cells suspended inside the gel prior to injection expressed RFP (red), allowing for direct visualization of these distinct cell populations and to explore interactions between them. On day 0, the mesenchymal spheroids were introduced into the chip and trapped in the correct locations, where they maintained their spherical shape. On day 3, we observed an initial organization of the endothelial cells (Fig. 2c), and by day 7 a three-dimensional endothelial network was formed (Fig. 2d). We also determined endothelial cell proliferation over time in the microfluidic channels near the trap site by quantifying the area of the image covered by the HUVEC cells (Fig. 2e). Due to the presence of fibroblasts in the mesenchymal cell aggregates, the GFP-labelled HUVEC (green) cells were found to spread rapidly. RFP-labelled HUVEC (red) cells initially located in the corners of the main channel, also proliferated and coated the walls of the microchannels.

Next, we examined whether the angiogenic sprouts from the cells suspended in the gel and endothelium formed in the mesenchymal spheroids connected to form a functional network. Intriguingly, we observed spontaneous anastomosis between the RFP-HUVEC endothelial bed and the endothelium from the mesenchymal spheroids, establishing an interconnected network (Fig. 2f). Thus, the serpentine geometry chips we designed allowed us to establish anastomosed endothelial networks.

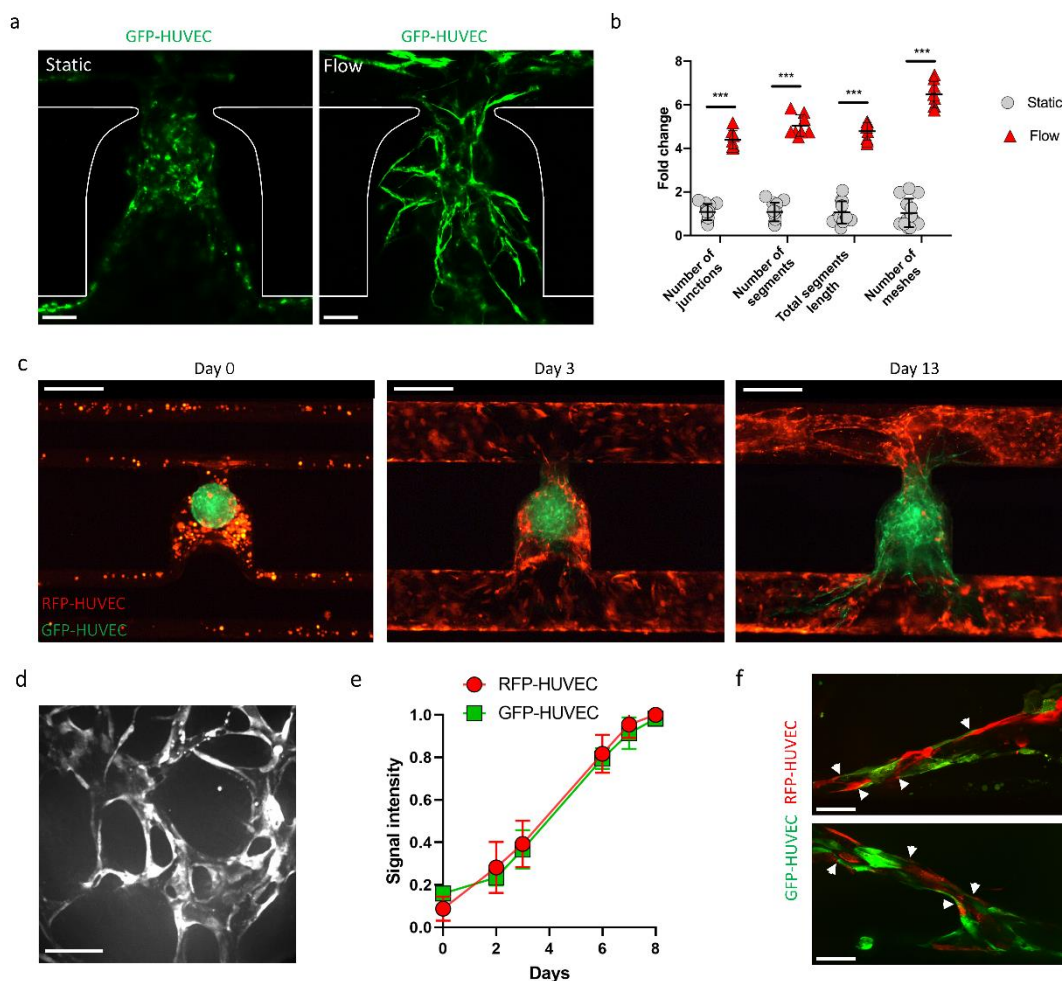


Fig. 2. Angiogenic sprouts of RFP-labelled HUVEC (red) cells in the fibrin hydrogel from the main channel anastomose with GFP-labelled HUVEC (green) cells present in the mesenchymal spheroid. a, Confocal z-stack maximum intensity projection renderings for GFP-HUVEC cells of the mesenchymal spheroids cultured alone under static or flow conditions. Representative images are shown at day 8 after seeding. **b,** Angiogenesis Analyzer

outputs of the abundance and vessel lengths of the endothelial networks, reported as a fold change relative to the static condition. Data points indicate results from $n = 13$ and 8 (static and flow conditions, respectively) independent microchannels from $n = 3$ different experiments. **c**, Time resolved evolution of the endothelial network. Gel embedded RFP-HUVEC cells in the main channel are shown in red, GFP-HUVEC cells from the mesenchymal spheroids are shown in green. Note the formation of structured endothelial networks over time that appear to be stable until the end of the observation period (day 13 after seeding). **d**, Confocal z-stack maximum intensity projection of the three-dimensional endothelial network. Image is representative of experiments from $n = 12$ independent microchannels. **e**, Quantification of RFP-HUVEC and GFP-HUVEC cell proliferation. Intensity signals were normalized by the maximum intensity signal of each image series, corresponding to the RFP-HUVEC and GFP-HUVEC cells covered areas of analyzed microfluidic channel over time, as shown in **(c)** ($n = 6$ independent microchannels). **f**, Anastomosis between RFP-HUVEC and GFP-HUVEC cells indicated by white arrows. Scale bars, $100\ \mu\text{m}$ (**a**), $400\ \mu\text{m}$ (**c**), and $50\ \mu\text{m}$ (**e,f**). Data represents mean \pm s.d. Statistical significance was attributed to values of $P < 0.05$ as determined by unpaired t test (two-tailed). $***P < 0.001$. No significant differences were found in cell proliferations as determined by a two-way ANOVA with Šidák multiple comparisons tests.

Functionality of the endothelial network

To demonstrate the functionality of the interconnected endothelial network, we performed perfusion assays using red fluorescent microbeads. To visualize possible flow through all possible paths within the network, beads with a $1\ \mu\text{m}$ diameter were injected at a flow rate of $Q_+ = 10\ \mu\text{l}/\text{min}$ to the organ-on-chip on the day 13 of culture (Fig. 3a, Supplementary Video 1). Importantly, the majority of the beads travelled through the endothelial network along the main perfusion direction (path A). As expected, some beads also perfused through the secondary pathway (path B). Of note, as the experiment was done at a constant flow rate, the velocity of a microbead was inversely proportional to the cross-sectional area it flowed through, hence the velocity decreased in regions without endothelium. This resulted in an intense fluorescent signal on the bottom left and top right corners of the imaged area (Fig. 3a).

We next analyzed the distribution of the microbeads within the endothelial network over time; this was done by counting the numbers of pixels in each frame of the binarized and frame-color-coded movies that corresponded to the movements of the microbeads. Interestingly, the microbeads perfused the whole endothelial network without any apparent prioritization of any particular area (Fig. 3b, Supplementary Video 2 and Supplementary Fig. 5). In the microchannels shown in Fig. 3c and d, a smaller number of beads was introduced at a lower flow rate of $Q_- = 0.1\ \mu\text{l}/\text{min}$ to visualize the motions of individual microbeads (see also Supplementary Video 3). Superposition of the tracked microbeads (red signals) and the green fluorescent signal coming from the mesenchymal cell aggregate endothelium confirmed perfusion of the network. These results demonstrate that the integrated endothelial networks are functional and readily perfusable.

Lastly, we investigated the physiological relevance of our microfluidic platform. The observed flows in the recorded networks were characterised by tracking fluorescent microbeads as they entered the endothelial network. Depending on the flow rate imposed by the syringe pump, microbeads moving through the microvessels exhibited fluid velocities ranging from $v_{min} = 100\ \mu\text{m}/\text{s}$ to $v_{max} = 7500\ \mu\text{m}/\text{s}$. Assuming laminar flow, one can deduct from these values the shear rate in the fluid at the vessel wall, which is given by $\dot{\gamma}_w = \frac{4\bar{v}}{R}$, where R is the radius of the vessel and \bar{v} the linear fluid velocity (Supplementary Note 2). Thus, $\dot{\gamma}_w$ ranged from 27 to $2000\ \text{s}^{-1}$. The mean (\pm s.d.) velocity over the perfused network at Q_- , and associated shear rate, were $\bar{v} = 502 \pm 305\ \mu\text{m}/\text{s}$ and $\dot{\gamma}_w = 134 \pm 81\ \text{s}^{-1}$, respectively ($n = 4$ beads individually tracked). The mean (\pm s.d.) velocity over the perfused network at

Q_+ , and the associated wall shear rate, were $\bar{v} = 2689 \pm 531 \mu\text{m/s}$ and $\dot{\gamma}_w = 531 \pm 142 \text{ s}^{-1}$, respectively ($n = 4$ beads individually tracked) (Table 1). The observed range of flux values was consistent with the flow rates detected in the human capillaries, corresponding to velocities of $\bar{v} = 500\text{--}1500 \mu\text{m/s}$ and wall shear rates of $\dot{\gamma}_w = 50\text{--}1900 \text{ s}^{-1}$ ref. 35. Thus, the observed perfusion flow in our organ-on-chip device resembles physiologic flow observed in human capillaries.

Experimental flow-rate ($\mu\text{L}/\text{min}$)	Velocity ($\mu\text{m}/\text{s}$)		Shear rate (s^{-1})	
	On-chip	Physiological	On-chip	Physiological
$Q_- = 0.1$	$v_{min} = 100$ $\bar{v} = 502 \pm 305$	$v_{min} = 500$	$\dot{\gamma}_{w min} = 26$ $\dot{\gamma}_w = 134 \pm 81$	$\dot{\gamma}_{w min} = 50$
$Q_+ = 10$	$\bar{v} = 2689 \pm 531$ $v_{max} = 7500$	$v_{max} = 1500$	$\dot{\gamma}_w = 531 \pm 142$ $\dot{\gamma}_{w max} = 2000$	$\dot{\gamma}_{w max} = 1900$

Table 1. Summary of different flow parameters measured on the organ-on-chips as compared to *in vivo* physiological flow rates in human capillaries. Data represent mean values \pm s.d.

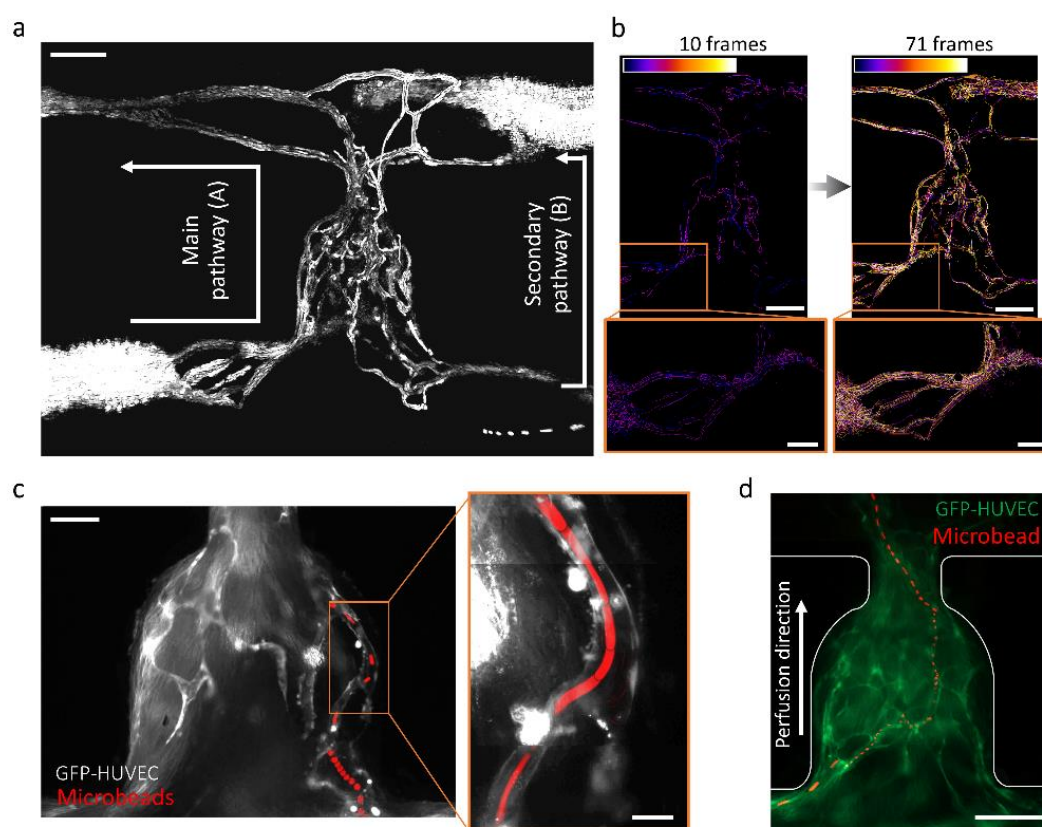


Fig. 3.

Functionality of the interconnected endothelial networks. **a**, Maximum of intensity projection over a 71 images stack, highlighting the tracks of the microbeads passing through the interconnected network. The stack was obtained after an image subtraction process. See Supplementary Video 1 and Supplementary Fig. 5 for raw movies and details. **b**, Sum of the binarized and frame-color coded images from (a) showing time-resolved beads perfusion. See Supplementary Video 2 for details. **c-d**, Projections of maximum intensity over an image stack showing tracking of one individual microbead (red) passing through the endothelial network. The inset shows an assembled projection of three movies taken at the indicated area at higher magnification. For better visualization, the RFP-HUVEC cells are not shown in these images. See Supplementary Video 3 for raw data. Beads were $1 \mu\text{m}$ (a), $4.8 \mu\text{m}$ and $0.5 \mu\text{m}$ (c and inset), and $3.2 \mu\text{m}$ (d) in diameter. Scale bars, $200 \mu\text{m}$ (a, b and d), $100 \mu\text{m}$ (b (insets) and c) and $20 \mu\text{m}$ (c (inset)).

Blood vessel organoids

While significant progress has been made in the development of complex organoids, the convergence of human tissue engineering and microfluidics is needed to address the technical challenges that remain, in particular to vascularize 3D tissues to support extended growth and differentiation²⁵. To further show the utility of our device design, we seeded 3D human blood vessel organoids (BVOs) generated from human-induced pluripotent stem cells (hiPSCs) onto our chip. We have previously reported the generation of such organoids³⁶ and demonstrated their physiological relevance for modelling diabetic vasculopathy²⁶. Slight modifications were made to the BVO differentiation protocol to ensure that the organoids were homogenous and fit into the microfluidic chip and the U-shaped trap, detailed in the Methods section. Importantly, the organoids self-organize into three-dimensional interconnected networks of bona fide capillaries containing an endothelial cell lined lumen, pericyte coverage and a prototypic basal membrane.

Mature blood vessel organoids, GFP-HUVEC cells (6×10^6 cells/ml) and fibroblasts (2×10^6 cells/ml) were embedded within the hydrogel and introduced into the microchannels as described above. The HUVEC cells self-organized into endothelial networks arborizing the seeded BVOs after a few days in culture (Fig. 4a). HUVEC networks with hollow lumen structures were observed after on-chip immunostaining on day 13 of culture (Fig. 4b). All the GFP-HUVEC vessels were CD31 positive (CD31⁺) after immunostaining, showing that the microvascular networks can be readily perfused with the anti-CD31 antibody (Fig. 4c). Functionality of the HUVEC networks was also assessed by the perfusion of fluorescent microbeads through the microchannels after 13 days of culture (Fig. 4d, Supplementary Video 4). We determined the reproducibility of our method by quantifying the developed microvascular networks in the U-cup trap area after 10 to 14 days of culture from independent experiments, *i.e.* from different batch of organoids, cells, hydrogels and microfluidic chips. The number of junctions, the number of segments, the total segment length and the number of meshes were evaluated using the Angiogenesis Analyzer plugin in ImageJ (Supplementary Fig. 6). No significant difference between the experiments was found (Fig. 4e). Thus, these findings demonstrate the robustness of our microfluidic platform to form stable endothelial networks in a reproducible way, arborizing the trapped BVO.

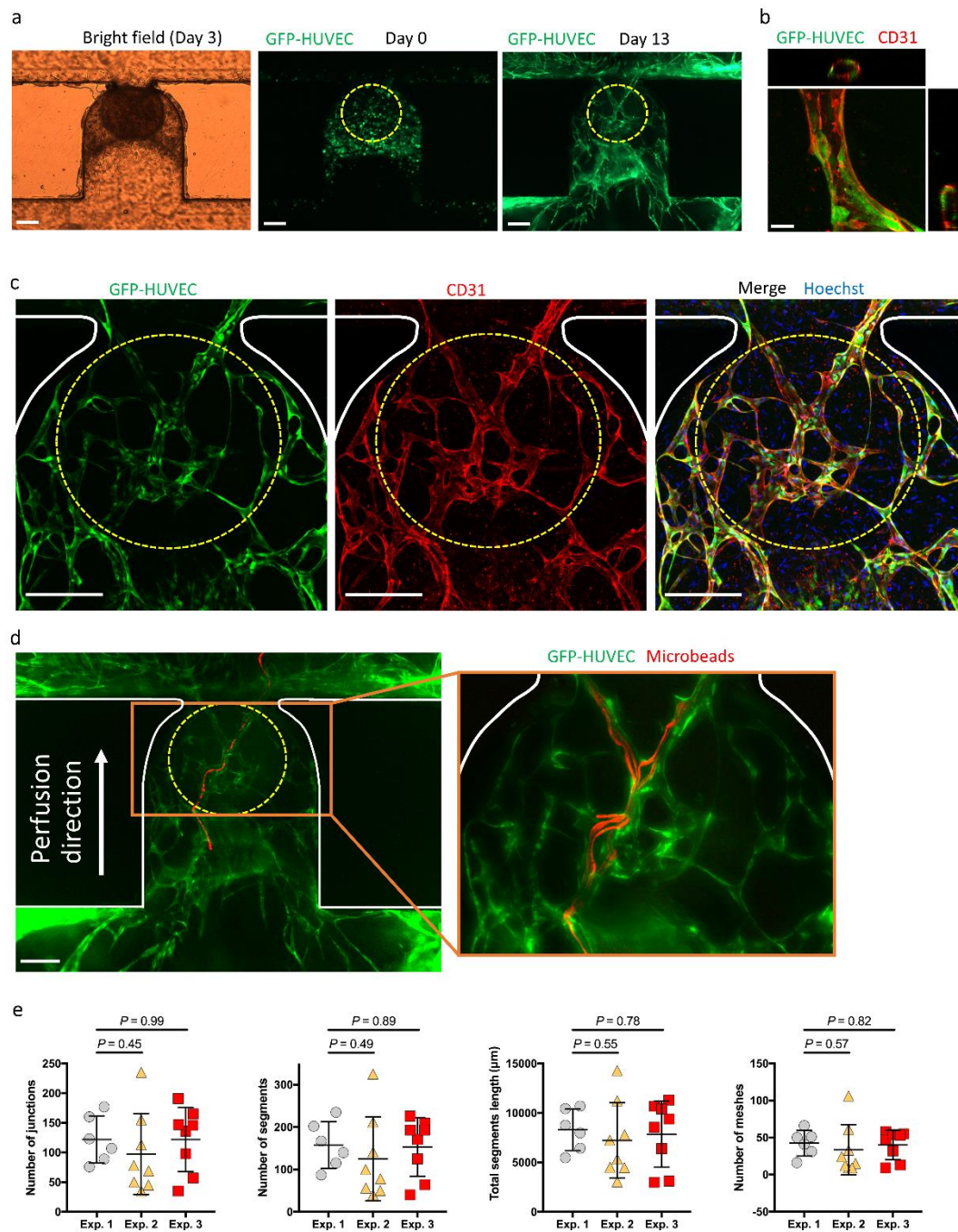


Fig. 4.

Establishment of perfusable HUVEC endothelial networks around blood vessel organoids. **a**, Time resolved evolution of the cell culture on chip. GFP-HUVEC cells self-organized into an endothelial network surrounding the organoid (circled in yellow from phase contrast images). **b**, Vessel from the endothelial HUVEC network (stained for the endothelial marker CD31) with orthogonal views showing hollow lumen structures. **c**, Confocal z-stack maximum intensity projection of the endothelial network at day 14 after staining of the microfluidic chip for CD31 expression and the nuclear marker Hoechst. **d**, Projection of maximum intensity over an image stack showing the tracking of one individual microbead (red) passing through the endothelial network (green). The inset shows the perfusion of several microbeads at higher magnification. See Supplementary Video 4 for raw movies. **e**, Angiogenesis Analyzer output of the endothelial networks after two weeks of culture for four parameters: (i) numbers of junctions, (ii) number of segments, (iii) total segments length and (iv) number of meshes. Experiments were repeated on $n = 22$ microchannels from $n = 3$ different experiments and data are plotted as mean \pm s.d. Scale bars, $200 \mu\text{m}$ (**a**, **c**, **d**) and $20 \mu\text{m}$ (**b**).

Next, we examined anastomoses between the endothelial networks formed by HUVEC cells and the seeded BVOs. Proper vascularization of organoids remains a major challenge in the field³⁷. Having previously shown that BVOs transplanted into the kidney capsule of mice formed functional connections with the host vasculature, we tested whether we could achieve the same *in vitro* with the HUVEC endothelial network. After 10 to 14 days of on-chip culture, the microchannels were fixed and stained *via* a dynamic on-chip protocol where PFA 4%, blocking buffer, primary antibody, secondary antibody and Hoechst solutions were sequentially flowed into the microchannels. Red fluorescent-labelled anti-CD31 antibody staining revealed staining of endothelial cells internal to the BVO vasculature (Fig. 5a). Numerous BVOs vessels (CD31⁺GFP⁺) were observed near GFP-HUVEC vessels, indicating functional perfusion from the HUVEC endothelial bed into the organoids' vessels (Fig. 5b). Importantly, we were also able to identify several interfaces showing anastomosis between the HUVEC endothelial network and BVO vessels (Fig. 5c and Supplementary Fig. 7). Of note, in regions where the HUVEC network was very dense, the BVOs were concealed, making them difficult to observe. Thus, we plotted the region of interest mean values from z-stacks of green (HUVECs) and red (CD31 staining detecting HUVEC and BVO endothelial cells) channels (z-axis profiles) for 6 different BVOs-on-chip (Fig. 5d). In the analyzed areas, red and green signal curves overlapped in the first images of the z-stacks (close to the bottom of the chip) and diverged when reaching the organoid. This analysis further confirmed that GFP⁺ BVO vessels were perfused and labelled with the anti-CD31 antibody.

Finally, we performed microbead perfusions on-chip. Since the beads preferentially flow along the paths of least fluid resistance, the likelihood that they will enter the narrow vasculature of the organoid is low. Nevertheless, with a large number of infused beads, we were able to demonstrate the passage of 2 μm microbeads within large vessels of the organoids (Fig. 5e and Supplementary Fig. 8). Control experiments were performed with BVOs cultured in low-attachment 96 U-wells either immersed in media or embedded in hydrogel. Phase contrast images showed that endothelial sprouts were able to expand in the fibrin hydrogel after a few days of culture. However, immunostaining of BVOs cultured in such conditions was not achievable, showing that neither the antibodies nor the Hoechst molecules were able to diffuse through the hydrogel, contrary to on-chip cultures where the antibodies can reach the BVO *via* the endothelial network and its functional connections with BVO vasculature. Together, these results show that our method is suitable for connecting HUVEC endothelial networks with bona fide blood vessel organoids to organize a perfusable vascular network. This *in vitro* microfluidic system represents a significant step forward in the field of vascularized organoids-on-chip and demonstrates the possibility of infusing different molecules (small-molecule drugs, nucleic acids, antibodies, etc.) or cells into the stem cell-derived blood vessel organoids through the microchannels.

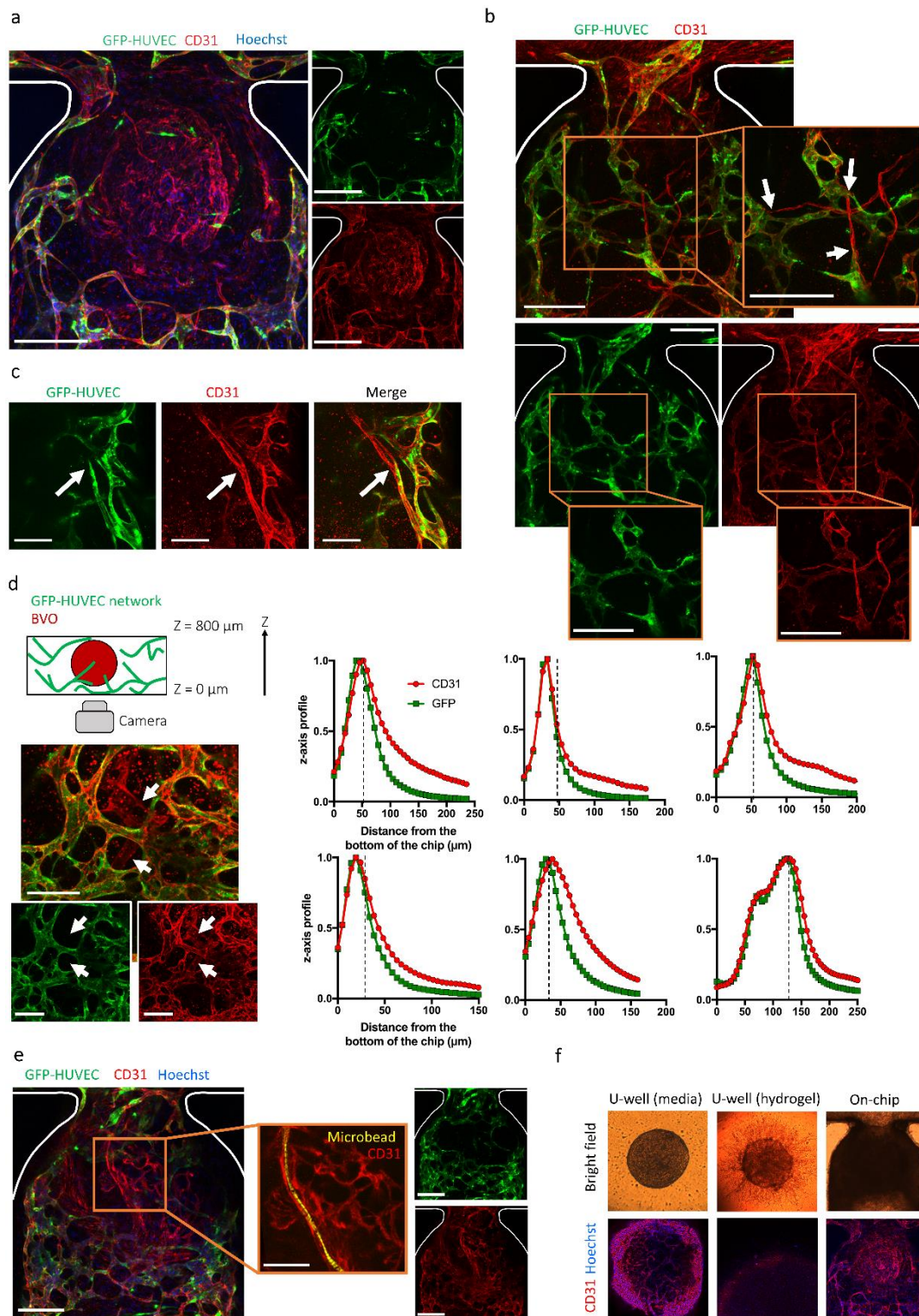


Fig. 5. Assessment of functional anastomosis between an HUVEC endothelial bed and stem cell engineered blood vessel organoids. **a-b**, Confocal z-stacks maximum intensity projection at day 10 after staining of the microvessels for CD31 expression (red) and the nuclear marker Hoechst. The BVO vasculature corresponding to CD31⁺GFP⁺ vessels is visible in the center of the trap. Areas where BVO vessels (CD31⁺GFP⁺) merge with the endothelial HUVEC network (CD31⁺GFP⁺) are indicated with white arrows. **c**, Anastomosis of a GFP⁺ HUVEC vessel with iPS cell-derived blood vessels of the organoid. **d**, Confocal z-stack maximum intensity projection after immunostaining to detect CD31⁺ (red) endothelial cells and detection of GFP⁺ (green) HUVECs (left). The image is representative of n = 6 independent microchannels from n = 3 different experiments for which the z-axis profiles

are shown (right). For each graph, a vertical dotted line highlights the divergence of green and red signals, revealing the BVO immunostaining deep inside the microfluidic chip. **e**, Projection of maximum intensity over an image stack showing the tracking of one individual microbead (yellow) passing through the BVO endothelium. Right panels show red and green color channels separately. **f**, Phase contrast images and confocal z-stacks maximum intensity projection for vascular and nuclear markers of BVOs immersed in growth medium (U-well), embedded in hydrogel (U-well) and vascularized on-chip. Scale bars, 200 μm (**a**, **b**, **e** and **f**), 100 μm (**c**, **d** and **e** (inset)).

Discussion

In this paper we present a new microfluidic platform which provides simple and robust solutions to form vascularized organoids-on-chip with precise control over the fluxes generated during short- and long-term perfusion. Through this new approach, we can counteract confining issues often encountered by organ-on-chip technologies, such as the numerous manual operations and lack of automation in spheroid or organoid location and hydrogel handling. First, the device was manufactured using COC, a material readily adapted by industry, avoiding the complications of PDMS systems such as incompatibility with hydrophobic compounds or adsorption of molecules. Second, in most studies, the flow rate is determined by hydrostatic pressure, a simple and cost-efficient liquid actuation principle. However, the optimum hydrostatic pressure difference cannot be maintained for a long time, with the consequence that the culture medium has to be changed regularly^{6,38,39}. This can be avoided by using rocker perfusion platforms^{14,40}, but this is not representative of *in vivo* flows. In our study, this has been overcome through the use of a syringe pump. Using 20 ml syringes, the microfluidic perfusion can be maintained for two weeks at a flow rate of 1 $\mu\text{l}/\text{min}$ without disconnecting the syringes. It should be noted that by using a 10-channel syringe pump, as was done in this study, flows in 10 different channels can be easily monitored in parallel. Third, the organoids and hydrogels were passively placed into a hydrodynamic trap, wherein the cells were subjected to minimal shear stress. These traps can be designed in series, thus hosting multiple vascularized organoids (including different tissue organoids) interconnected through endothelial networks.

Cell and hydrogel loading, as well as long-term organoid perfusion with the growth medium, were performed through a single fluidic inlet. This automated method of fluid handling provides the simplicity required for distributing microfluidic devices to industries or hospitals. Finally, the presented microfluidic platform offers robustness through an innovative encapsulation technique, which relies on hydrodynamic and capillary effects that are largely independent of the working pressure. While gel loading is often a delicate step in conventional chip designs found in the literature, the process used in this study is highly reproducible and easy to perform. The loading steps can be performed in seconds, allowing all operations to be completed at room temperature. In summary, this new organ-on-chip platform is very robust and user-friendly, overcoming some of the key hurdles to industrialize organ-on-chips and to provide greater access to user-friendly organoid-on-chip technologies.

Our microfluidic device permits the vascularization and perfusion of a biological 3D tissues. The formation of endothelial networks was found to be highly reproducible. Importantly, we were able to generate physiological fluxes in these networks, with observed velocities ranging from $v = 100 \mu\text{m}/\text{s}$ to $v = 7500 \mu\text{m}/\text{s}$ and shear rates ranging from $\dot{\gamma} = 25 \text{ s}^{-1}$ to 1500 s^{-1} . Thus, blood flow velocities and shear rates in human capillaries, ranging from 500 to 1500 $\mu\text{m}/\text{s}$ and 100 to 500 s^{-1} , respectively, can be readily reached using our microfluidic platform. This contrasts with what has been reported in literature, wherein devices operated by hydrostatic pressure often lead to lower flow rates²². Finally,

the deposition of the hydrogel on the walls of the microchannels, conditioned by the Landau-Levich-Bretherton effect, offers a robust method of endothelialization of the perfusion channel. This eliminates the need to coat the channels and tilt the chips to adhere cells to the walls, as is often reported^{41,42}.

The chip configuration described here resulted in anastomosis between an HUVEC endothelial bed and the endothelium of our blood vessel organoids. These BVOs represent bona fide capillaries with a defined lumen, endothelial lining, pericytes, and formation of a prototypic basal membrane³⁶. However, the critical next step to use these human stem cell-derived BVOs to for instance model disease processes was never accomplished so far, namely to generate BVOs which can be perfused. Most importantly, in our current study, we have now accomplished intravascular perfusion of blood vessel organoids, thus making our microfluidic platform the first device to incorporate functional vasculature throughout the microfluidic channel into the embedded organoids. Our platform allows many diverse topics to be studied, such as organoid lifespan enhancement through vascularization, circulation and fate of immune cells in organoids, exposure to drugs, nucleic acids or metabolic stress. The device we have developed also offers the flexibility to vascularize other types of pre-endothelialized organoids, spheroids, tumoroids, or human tissue explants.

Methods

Trapping principle and cell seeding

A syringe was used as a reservoir at the entrance of the microfluidic channel to inject three fluid phases in the following order: the hydrogel (1) in which spheroids/organoids and endothelial cells were embedded, the air (2), and the growth medium (3). The microfluidic channel was composed of a serpentine-shaped loop channel with a narrow U-cup-shaped region that functioned as a cell aggregate trap. When the trap was empty, the hydraulic resistance R_1 along the trap (Path A) was lower than the one along the loop channel (R_2 , Path B). As a result, a spheroid/organoid in the flow was carried into the trap. The loading of different components was done through a syringe pump connected to the outlet of the channel in its withdrawal mode at a flow rate of $Q = 300 \mu\text{l}/\text{min}$. A spheroid/organoid was collected from a 96-well plate using a pipette tip and then put in the hydrogel mixture. 50 μl of the hydrogel containing the spheroid/organoid was put into the reservoir at the entrance of the device and introduced in the channel, where the spheroid/organoid was trapped inside the U-cup-shaped microchamber. Air was introduced in the same manner before the hydrogel's polymerization. The hydrogel was thus pushed to the outlet of the channel. Due to the capillarity, the gel remained in the U-cup site where the spheroid/organoid was trapped, and a thin layer of gel coated the corners of the channel. After the gel's polymerisation at room temperature for 15 min, growth medium was introduced. Using this set-up, the organoid was affixed in a central microchamber, surrounded by a perfusion channel to allow flow of the growth medium. Finally, the organ-on-a-chip setup was placed inside an incubator at 37°C and 5% CO₂ (Supplementary Fig. 1).

Cell culture and generation of spheroids and organoids

Primary human fibroblasts were extracted from skin explants obtained through the elective breast surgery of a healthy young woman following informed consent; this tissue was provided by Walid Rachidi, CEA, Grenoble. GFP- and RFP-labelled HUVEC cells were purchased from Angio-Proteomie (Boston, MA, US) and cultured in complete EndoGM medium (Angio-Proteomie). Passage 5–7 cells

were used for the experiments. Fibroblasts cultured in DMEM, high glucose, GlutaMAX Supplement (Gibco, Grand Island, NY, US), and passage 6–8 cells were used for the experiments. We prepared fibroblasts and HUVEC co-culture, termed mesenchymal cell spheroid model here, in a U-shaped 96-well microplate with an ultra-low attachment surface (Corning, NY, US). Fibroblasts and HUVEC cells were mixed at a ratio of 1:1 (5000 cells per well) in 150 μ l of medium. After pre-culturing for 1 day in the microplate, a spheroid was introduced into the device. A mix of CnT-ENDO / CnT-Prime Fibroblast medium (CELLnTEC, Bern, Switzerland) 1% Pen-Strep (PAN Biotech, Aidenbach, Germany) was used for the microfluidic perfusion of the fibroblasts and HUVEC co-culture spheroids. RFP-HUVEC cells were suspended in the hydrogel at a concentration of 6×10^6 cells per ml.

3D human blood vessel organoids were generated from human induced pluripotent stem cells (hiPSCs) as previously described³⁶. In brief, stem cell colonies were harvested using Accutase (SigmaAldrich) to get a single cell suspension. To make sure that the organoids would be of an appropriate size to fit into the 800 μ m x 800 μ m square profile microchannels of the chip used for BVO experiments, AggreWell™400 (STEMCELL Technologies) plates were used. Each well of the plate contains 1200 microwells with a 400 μ m diameter. 600000 single stem cells were seeded per well (500 cells/microwell) in aggregation media with 50 μ M Y27632 (STEMCELL technologies). Mesoderm induction and sprouting was induced directly in the AggreWell™400 plates by carefully changing the media with a p1000 pipette making sure to not disturb the cell aggregates in the microwells. For Collagen I-Matrigel embedding, organoids were harvested from the AggreWell™400 plate by vigorously pipetting up and down with a cut p1000 tip close to the bottom of the well. Harvested organoids were embedded in a 12-well plate (approx. 100 organoids/12-well), and subsequently cut out and singled into low attachment 96 U-well plates 4-5 days after embedding as previously described³⁶. No alterations were made to any of the BVO differentiation media. The BVOs were maintained in a differentiation medium containing 15% FBS (Gibco), 100 ng/ml VEGF-A and 100 ng/ml FGF-2. The BVOs grew slightly after removal from the AggreWell™400 plate, so 4 days after singling organoids with a diameter of 500-600 μ m were selected and added to the microfluidic chip. After adding BVOs to the microfluidic chip, a mix of the differentiation medium with CnT-ENDO and CnT Prime Fibroblast media was used (ratio 1:1:1).

Hydrogel preparation

A fibrin-hydrogel made of 6.6 mg/ml fibrinogen, 0.15 TIU/ml aprotinin, 2.5 mM CaCl₂, and 1 U/ml thrombin prepared in HEPES-buffered saline (Sigma–Aldrich, Taufkirchen, Germany) was used in all experiments. After adding the thrombin (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA) into the mixture, all the procedures were quickly performed to avoid premature gelation.

Device fabrication

Computer-aided design (CAD) files of the chip were generated using Solidworks 2018 (Dassault Systèmes, Vélizy-Villacoublay, France). The microfluidic chips were made of Cyclic Olefin Copolymer (COC) because of its low autofluorescence, strong chemical resistance, and low drug absorption. Microfluidic patterns were directly machined on a COC sheet (TOPAS, USA), using high-precision milling (DATRON M7HP equipment). The chip (84x54 mm²) contained 10 identical microfluidic channels. The square-profiled channels were 400 μ m x 400 μ m for the experiments with mesenchymal spheroids, and 800 μ m x 800 μ m for experiments with blood vessel organoids. The microfluidic channels were sealed with a MicroAmp optical adhesive film (Applied Biosystems, Foster City, USA).

Cell imaging

The microfluidic chip was imaged using an inverted Olympus IX50 microscope every day for the period of the experiment. Images were taken in bright field, green fluorescence, and red fluorescence channels, with 4x, 0.1 N.A and 10x, 0.3 N.A objectives, equipped with a CCD camera interfaced with Point Grey software. Images showing anastomosis were taken using an inverted microscope (Zeiss Observer Z1) with a 20x, 0.4 N.A objective equipped with an Axiocam 503 mono CCD camera and ApoTome technology (optical sectioning using structured illumination). Images of the network shown in Fig. 2d were taken using a confocal spinning disk system, consisting of an EclipseTi-E Nikon inverted microscope, equipped with a CSUX1-A1 Yokogawa confocal head, an Evolve EMCCD camera (Roper Scientific, Princeton Instruments), and a 20x, 0.75 N.A. objective, interfaced with MetaMorph software (Universal Imaging). Images of the vascular networks and blood vessel organoids were taken using a confocal microscope, Zeiss LSM800, with 10x, 0.3 N.A and 63x, 1.4 N.A (for hollow lumen) objectives. The flow in vascular networks was assessed in the second week of culture by loading polystyrene fluorescent microbeads (Thermo Fisher Scientific Fluoro-Max Fluorescent Beads) into the serpentine channel. Images were captured at 15 Hz using the inverted Olympus IX50 microscope described above. Microbeads were tracked in perfused tissues from separate microfluidic channels using ImageJ (National Institute of Health, New York, NY, USA).

Light sheet fluorescence microscopy

A homemade light sheet fluorescence microscope was used in this project, which we adapted to image biological samples inside microfluidic chambers without interfering with the normal function of the chip. The light sheet was generated with a 488 nm Ar-laser, focused by a 100 mm focal length cylindrical lens. The fluorescence signal generated at the illuminated plane was collected by a long working distance, with the objective (Mitutoyo M Plan APO SL 20X, 0.28 N.A.) placed at 90° to the excitation path. The sample plane was at 45° from both of these paths. A tube lens was associated to the objective to form the image of the fluorescent structure onto a high-sensitive sCMOS camera (Hamamatsu HPF6 ORCA FLASH 4.0 V3) with a magnification factor of 12. To filter out the laser excitation, a high pass (cut-off wavelength of 490 nm) interference filter was used. The sample was mounted onto a custom-designed holder attached to computer-controlled xz linear translational stages. In this configuration, the microfluidic chip was kept horizontal, and the thinner lateral part of the light sheet was positioned at the surface of the gel. The light sheet illuminated the sample in the direction perpendicular to that of the microfluidic channel (Supplementary Fig. 4).

On-chip immunofluorescent staining

For immunofluorescent staining, the cells and organoids were fixed by flowing 4% paraformaldehyde (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany) for 1 h at room temperature through the microchannel, and subsequently blocked with 3% FBS, 1% BSA, 0.5% Triton-X-100 and 0.5% Tween for 2 h at room temperature. Primary antibodies (CD31, Rabbit, Abcam clone EP3095 ab134168) were diluted at 1:300 in blocking buffer and flowed overnight into the microfluidic chip at 4°C. After a 30 min wash in PBST (0.05% Tween), Cy3-conjugated secondary antibodies (Donkey Anti-Rabbit, Jackson ImmunoResearch Inc.) were flowed into the microchannels at 1:300 in blocking buffer for 2 h at room temperature. After a 30 min wash in PBST, nuclear counter-staining using Hoechst was carried out according to a routine protocol.

Endothelial networks analysis

Confocal z-stacks of the microchannels in various culture conditions were taken. These stacks were then flattened in ImageJ to a 2D maximum intensity projection and analysed using the Angiogenesis Analyzer plugin with default settings⁴³. Four metric parameters were selected for this study, namely the number of junctions, the number of meshes, the number of segments and the total segments length.

Statistical analysis

Results are shown as mean \pm s.d. as indicated in the Figure legends. Two-way ANOVA with Šidák multiple comparisons tests and unpaired t-test (two-tailed) for comparisons were conducted using GraphPad Prism 9 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Exact *P* values are provided in the Figures.

Code availability

Associated code for image analysis is available at: <https://github.com/ClementQuintard/Vascularized-Organoids>

Acknowledgments

We thank N.Verplanck and F.Boizot for the manufacturing of microfluidic chips, and X.Mermet for his help with light sheet microscopy experiments. This work was supported by the CEA “OOC inflexion” and received funding from GRAL, a programme from the Chemistry Biology Health (CBH) Graduate School of University Grenoble Alpes (ANR-17-EURE-0003). G.J. and J.M.P. were funded by the Vienna Science and Technology Fund (WWTF) through project COV20-002. J.M.P was further funded by the Austrian Federal Ministry of Education, Science and Research, the Austrian Academy of Sciences and the City of Vienna and grants from the Austrian Science Fund (FWF) Wittgenstein award (Z 271-B19), the T. von Zastrow foundation, the Innovative Medicines Initiative 2 Joint Undertaking (JU) under grant agreement No 101005026, and the Canada 150 Research Chairs Program F18-01336, the Canadian Institutes of Health Research COVID-19 grants F20-02343 and F20-02015, an Allen Distinguished Investigators (ADIs) award, and the Leducq foundation (ReVAMP).

Contributions

J.M.P., J-L.A., F.N., Y.F. and X.G. conceived and supervised the project; C.Q., C.L. and A.P. performed the experiments; G.J., N.W., A.L. and A.H. generated the blood vessel organoids; C.B., P.B. and C.Q. performed the experiments using light sheet microscope and analyzed the images; C.Q., X.G. and J.M.P wrote the manuscript with inputs and comments from all coauthors. All authors discussed the data and agreed on the final manuscript.

References

1. Auger, F. A., Gibot, L. & Lacroix, D. The Pivotal Role of Vascularization in Tissue Engineering. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **15**, 177–200 (2013).
2. van Duinen, V., Trietsch, S. J., Joore, J., Vulto, P. & Hankemeier, T. Microfluidic 3D cell culture: from tools to tissue models. *Curr. Opin. Biotechnol.* **35**, 118–126 (2015).
3. Liu, H. *et al.* Advances in Hydrogels in Organoids and Organs-on-a-Chip. *Adv. Mater.* **31**, 1902042 (2019).
4. Whisler, J. A., Chen, M. B. & Kamm, R. D. Control of Perfusable Microvascular Network Morphology Using a Multiculture Microfluidic System. *Tissue Eng. Part C Methods* **20**, 543–552 (2012).
5. Kim, S., Lee, H., Chung, M. & Jeon, N. L. Engineering of functional, perfusable 3D microvascular networks on a chip. *Lab. Chip* **13**, 1489–1500 (2013).
6. Alonzo, L. F., Moya, M. L., Shirure, V. S. & George, S. C. Microfluidic device to control interstitial flow-mediated homotypic and heterotypic cellular communication. *Lab. Chip* **15**, 3521–3529 (2015).
7. Nashimoto, Y. *et al.* Vascularized cancer on a chip: The effect of perfusion on growth and drug delivery of tumor spheroid. *Biomaterials* **229**, 119547 (2020).
8. Paek, J. *et al.* Microphysiological Engineering of Self-Assembled and Perfusable Microvascular Beds for the Production of Vascularized Three-Dimensional Human Microtissues. *ACS Nano* **13**, 7627–7643 (2019).
9. Shirure, V. S. *et al.* Tumor-on-a-chip platform to investigate progression and drug sensitivity in cell lines and patient-derived organoids. *Lab. Chip* **18**, 3687–3702 (2018).
10. Sobrino, A. *et al.* 3D microtumors in vitro supported by perfused vascular networks. *Sci. Rep.* **6**, 1–11 (2016).
11. Rambøl, M. H., Han, E. & Niklason, L. E. Microvessel Network Formation and Interactions with Pancreatic Islets in Three-Dimensional Chip Cultures. *Tissue Eng. Part A* (2019) doi:10.1089/ten.tea.2019.0186.
12. Homan, K. A. *et al.* Flow-enhanced vascularization and maturation of kidney organoids in vitro. *Nat. Methods* **16**, 255–262 (2019).
13. Cakir, B. *et al.* Engineering of human brain organoids with a functional vascular-like system. *Nat. Methods* **16**, 1169–1175 (2019).
14. van Duinen, V. *et al.* Perfused 3D angiogenic sprouting in a high-throughput in vitro platform. *Angiogenesis* **22**, 157–165 (2019).
15. Campisi, M. *et al.* 3D self-organized microvascular model of the human blood-brain barrier with endothelial cells, pericytes and astrocytes. *Biomaterials* **180**, 117–129 (2018).
16. Sano, E. *et al.* Engineering of vascularized 3D cell constructs to model cellular interactions through a vascular network. *Biomicrofluidics* **12**, 042204 (2018).
17. Moya, M. L., Hsu, Y.-H., Lee, A. P., Hughes, C. C. W. & George, S. C. In Vitro Perfused Human Capillary Networks. *Tissue Eng. Part C Methods* **19**, 730–737 (2013).
18. Wang, X. *et al.* A hydrostatic pressure-driven passive micropump enhanced with siphon-based autofill function. *Lab. Chip* **18**, 2167–2177 (2018).
19. Haase, K., Gillrie, M. R., Hajal, C. & Kamm, R. D. Pericytes Contribute to Dysfunction in a Human 3D Model of Placental Microvasculature through VEGF-Ang-Tie2 Signaling. *Adv. Sci.* **6**, 1900878 (2019).
20. Nashimoto, Y. *et al.* Integrating perfusable vascular networks with a three-dimensional tissue in a microfluidic device. *Integr. Biol.* **9**, 506–518 (2017).
21. van Duinen, V. *et al.* 96 perfusable blood vessels to study vascular permeability in vitro. *Sci. Rep.* **7**, 1–11 (2017).
22. Phan, D. T. T. *et al.* A vascularized and perfused organ-on-a-chip platform for large-scale drug screening applications. *Lab. Chip* **17**, 511–520 (2017).
23. Wang, X., Sun, Q. & Pei, J. Microfluidic-Based 3D Engineered Microvascular Networks and Their Applications in Vascularized Microtumor Models. *Micromachines* **9**, 493 (2018).
24. Zhang, B., Korolj, A., Lai, B. F. L. & Radisic, M. Advances in organ-on-a-chip engineering. *Nat. Rev. Mater.* **3**, 257–278 (2018).
25. Garreta, E. *et al.* Rethinking organoid technology through bioengineering. *Nat. Mater.* 1–11 (2020) doi:10.1038/s41563-020-00804-4.
26. Wimmer, R. A. *et al.* Human blood vessel organoids as a model of diabetic vasculopathy. *Nature* **565**, 505–510 (2019).
27. Jeon, J. S., Chung, S., Kamm, R. D. & Charest, J. L. Hot embossing for fabrication of a microfluidic 3D cell culture platform. *Biomed. Microdevices* **13**, 325–333 (2011).
28. Tan, W.-H. & Takeuchi, S. A trap-and-release integrated microfluidic system for dynamic microarray applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**, 1146–1151 (2007).

29. Tan, W.-H. & Takeuchi, S. Dynamic microarray system with gentle retrieval mechanism for cell-encapsulating hydrogel beads. *Lab Chip* **8**, 259–266 (2008).
30. Zbinden, A. *et al.* Non-invasive marker-independent high content analysis of a microphysiological human pancreas-on-a-chip model. *Matrix Biol.* **85–86**, 205–220 (2020).
31. Silva, P. N., Green, B. J., Altamentova, S. M. & Rocheleau, J. V. A microfluidic device designed to induce media flow throughout pancreatic islets while limiting shear-induced damage. *Lab. Chip* **13**, 4374–4384 (2013).
32. Nourmohammadzadeh, M. *et al.* A microfluidic array for real-time live-cell imaging of human and rodent pancreatic islets. *Lab. Chip* **16**, 1466–1472 (2016).
33. Quintard, C., Achard, J.-L. & Fouillet, Y. Method for achieving microfluidic perfusion of a spheroid and device suitable for implementing said method. (2021).
34. Ajaev, V. S. & Homsy, G. M. Modeling shapes and dynamics of confined bubbles. *Annu Rev Fluid Mech* **38**, 277–307 (2006).
35. Hathcock James J. Flow Effects on Coagulation and Thrombosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **26**, 1729–1737 (2006).
36. Wimmer, R. A., Leopoldi, A., Aichinger, M., Kerjaschki, D. & Penninger, J. M. Generation of blood vessel organoids from human pluripotent stem cells. *Nat. Protoc.* **14**, 3082–3100 (2019).
37. Zhang, S., Wan, Z. & D. Kamm, R. Vascularized organoids on a chip: strategies for engineering organoids with functional vasculature. *Lab. Chip* **21**, 473–488 (2021).
38. Sudo, R. *et al.* Transport-mediated angiogenesis in 3D epithelial coculture. *FASEB J.* **23**, 2155–2164 (2009).
39. Song, J. W., Bazou, D. & Munn, L. L. Anastomosis of endothelial sprouts forms new vessels in a tissue analogue of angiogenesis. *Integr. Biol.* **4**, 857–862 (2012).
40. Nguyen, D.-H. T. *et al.* Biomimetic model to reconstitute angiogenic sprouting morphogenesis in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**, 6712–6717 (2013).
41. Oh, S. *et al.* “Open-top” microfluidic device for in vitro three-dimensional capillary beds. *Lab. Chip* **17**, 3405–3414 (2017).
42. Vickerman, V. & Kamm, R. D. Mechanism of a flow-gated angiogenesis switch: early signaling events at cell–matrix and cell–cell junctions. *Integr. Biol.* **4**, 863–874 (2012).
43. Carpentier, G., Martinelli, M., Courty, J. & Gascone, I. Angiogenesis analyzer for ImageJ. 4th ImageJ User and Developer Conference proceedings. (pp. 198-201).
<https://imagej.nih.gov/ij/macros/toolsets/Angiogenesis%20Analyzer.txt> (2012).

Annexe 2

Microfluidic device integrating a network of hyper-elastic valves for automated glucose stimulation and insulin secretion collection from a single pancreatic islet

Clément Quintard^{*a,b}, Emily Tubbs^{b,c}, Jean-Luc Achard^d, Fabrice Navarro^a, Xavier Gidrol^b and Yves Fouillet^a

a.Univ. Grenoble Alpes, CEA, LETI, DTBS, 38000 Grenoble, France.

b.Univ. Grenoble Alpes, CEA, INSERM, IRIG, BIOMICS, 38000 Grenoble, France.

c.Univ. Grenoble Alpes, LBFA et BEeSy, INSERM U1055, Grenoble, France.

d.CNRS, LEGI, F-38000 Grenoble, France.

Corresponding author: Clément Quintard; clement.quintard@cea.fr

Abstract

Advances in microphysiological systems have prompted the need for robust and reliable cell culture devices. While microfluidic technology has made significant progress, devices often lack user-friendliness and are not designed to be industrialized on a large scale. Pancreatic islets are often being studied using microfluidic platforms in which the monitoring of fluxes is generally very limited, especially because the integration of valves to direct the flow is difficult to achieve. Considering these constraints, we present a thermoplastic manufactured microfluidic chip with an automated control of fluxes for the stimulation and secretion collection of pancreatic islet. The islet was directed toward precise locations through passive hydrodynamic trapping and both dynamic glucose stimulation and insulin harvesting were done automatically via a network of large deformation valves, directing the reagents and the pancreatic islet toward different pathways. This device we developed enables monitoring of insulin secretion from a single islet and can be adapted for the study of a wide variety of biological tissues and secretomes.

Introduction

There is growing interest in the development of microfluidic platforms that allow manipulation of various biological tissues and control of stimuli for the study of complex biological processes¹. Recently, several studies have shown the value of microfluidic devices for applications as diverse as drug-induced cardiotoxicity², anticancer drug testing³ or pathogen detection⁴. These studies are very promising and highlight the unique advantages of this technology such as its robustness, multiplexing capabilities, low manufacturing and maintenance costs, and ability to precisely control small volumes of liquid as well of the microenvironment around cells to better mimic relevant physiological conditions.

Notably, the application of microfluidics to pancreatic islets perfusion devices constitutes a promising approach for the reasons mentioned above⁵⁻⁹. Building *in vitro* analytical tools is crucial to model the complexity of physiology and pathophysiology of pancreatic islets for a better understanding of its basic biology as well as for the screening of new drugs. While most common perfusion systems require pooling of multiple islets to achieve quantifiable insulin concentrations, minimizing the number of islets required for experiments using microfluidic platforms is important given the scarcity of these biological tissues. Several groups have developed microfluidic devices that ensure single-islet sensitivity to tackle this issue¹⁰⁻¹⁴. Despite this, adoption of microfluidic platforms in industry and hospitals has been relatively slow due in part to complex technical settings (ease of use, scalability, etc.)^{15,16}.

To improve automation and parallelization of microfluidic devices, many efforts were put on developing a microfluidic architecture with automatic hydrodynamic spheroid trapping, some of these involve parallel microchannels acting as a filter¹⁷, 3D biological objects sedimentation into microwells¹⁸, or micro-rotational flows¹⁹. The hydrodynamic trapping method, initially proposed by Tan and Takeuchi²⁰, is of particular interest considering the serpentine architecture accompanied by narrowed chambers functioning as traps, and was used for pancreatic islets^{21,22} as well as for cancer spheroids²³. Remarkably, Zbinden et al.²⁴ integrated such a microfluidic platform with a Raman microspectroscopy system to track the insulin secretion kinetics of pseudo-islets. However, these trapping devices are generally not coupled with fluid handling set-ups allowing complex biological assays on-chip. In particular, in this serpentine architecture with U-cup shaped constrictions, the flow is mostly redirected to the loop branch once the trap sites are occupied. It is thus crucial to reconfigure the design to force the flow through the trap sites where the islets are located in order to collect the secretions with high sensitivity. Valve-based microfluidics can be seen as the answer to overcome this challenge^{25,26}, but the small deformations that can be obtained with conventional PDMS, are better suited for single cell devices²⁷. When working with large 3D cell aggregates such as pancreatic islets (ranging from 50 μm to 500 μm), the elastic deformation properties of PDMS are no longer sufficient. However, reducing locally the dimensions of the fluidic microchannels to integrate valves is not an option, not only because of the fragility of pancreatic islets that cannot be deformed, but also because it would lead to excessive pressure losses, compromising the trap functioning. Recently, new types of materials qualified as hyper-elastic have been used for the fabrication of flexible robots²⁸.

Here, we developed a microfluidic platform that is compatible with the size range of pancreatic islets and features a fluidic circuit board allowing complex biological assays. A single human pancreatic islets was passively directed along the fluidic path of least resistance to a constriction zone. The functionality of the pancreatic islet in the chip was tested by a glucose stimulation insulin secretion (GSIS) assay. Glucose stimulation and harvesting of the secreted insulin were achieved in an automated way through the activation of a valve network within the chip. Overall, the device presented here displays an active and programmable valve-based microfluidic circuit around a functional pancreatic islet, using a hyper-elastic material overcoming classical limitations.

Materials and methods

Human pancreatic islets

Two sources of pancreatic islets were used in this study.

3D pancreatic islet microtissues were purchased from InSphero (Schlieren, Switzerland). Upon the arrival of pancreatic islet microtissues in 96-well GravityTRAP™ plates, the microtissues were treated according to the manufacturer's protocol and maintained in human islet maintenance medium (InSphero) before use (1 to 3 days). Age= 63, sex female (donor 1).

Human pancreatic islets were provided by the Diabetes Cell Therapy Laboratory, Institute of Regenerative Medicine and Biotherapies, St Eloi Hospital, Montpellier. The islets were isolated from the pancreas of brain-dead donors. The procedure was approved by the National Agency for Medicines and Health Products Safety (ANSM) in accordance with the French bioethics law (Act No.2004-800 of August 6, 2004, as amended by Act No.2011-814 of July 7, 2011). These procedures were carried out with approval by appropriate regulatory authorities. Islets were cultured in CMRL 1066 medium, 1g/L Glucose (Gibco, ref.041-96907A) supplemented with 10% FBS, 10% Glutamax 100X (Gibco, ref.35050.038), 10mM HEPES (Gibco, ref.15630-057), 100mg.Ul.mL⁻¹ Penicillin, 100 µg.mL⁻¹ streptomycin (Gibco, ref.15140-122), in a 5% CO₂ humidified atmosphere at 37°C. Viability of cells upon isolation= 80-90%, age= 60, sex male (donor 2). Islets with diameters greater than the constriction of 200 µm and smaller than the channel's size and width of 400 µm were selected upfront for all experiments.

Glucose stimulated insulin secretion (GSIS) assays

Static control

Human pancreatic islets were individually placed in a 96 well plate with ultra-low attachment surface (Corning, NY, USA), and incubated at 37°C, 95% O₂, 5% CO₂ for 1 hour in 150 µL KREBS buffer 1% BSA, 2.8 mM glucose as pre-incubation. Thereafter, islets were incubated for 1 hour with 2.8 mM glucose solution (low glucose solution, LGS) and for 1 hour with 16.7 mM glucose solution (high glucose solution, HGS). After each incubation step, supernatants were collected and stored at -80 °C. Insulin concentration in each collected supernatant was measured using STELLUX Chemiluminescence Human Insulin ELISA (ALPCO).

GSIS on-chip assay

Pancreatic islets were stimulated following a classic GSIS assay protocol adapted to a dynamic on-chip configuration. The chosen microfluidic architecture takes advantage of the control capabilities of the valves to direct the different reagents. Briefly, we performed a multi-step protocol using a network of valves integrated into the fluidic channels. First, a single human pancreatic islet was loaded into the chip through the main serpentine pathway at the flow rate of $Q = 100 \mu\text{L}/\text{min}$ (Fig. 1a, green path). The low (Fig. 1a, yellow path) and high (Fig. 1a, red path) glucose stimulation were then performed *via* different pathways induced by the actuation of the valves network to direct the flow appropriately. Finally, the islet was retrieved from the chip *via* the main serpentine pathway for further KCl stimulation. All these phases lasted one hour. All operations were done into a thermostatic chamber at 37°C. A low flow rate of $Q=2.5 \mu\text{l}/\text{min}$ was set for all the fully automated secretion phases.

Trapping principle and islets loading

The microfluidic channel was composed of a serpentine-shaped channel with a narrow U-cup shaped region that functioned as a 3D-cell aggregate trap (Fig. 1b). When the trap was empty, the islet followed the path of least hydrodynamic resistance (path A), while an islet occupying the trap site

allowed to bypass the U-cup shaped region and redirected the flow into the loop channel (path B). As a result, an islet in the flow was carried into the U-cup shaped constriction at a flow rate of $Q = 100 \mu\text{L}/\text{min}$ where it was then protected from high shear stress (see Supplementary Note 1 for details). In order to precisely monitor the flow, the loading of different components was done through a syringe pump connected to the outlet of the channel in its withdrawal. Islet stimulation and secretions collection were achieved through the lateral channels housing at the entrance two reservoirs for low and high glucose solutions, and connected to the syringe-pump at the outlets.

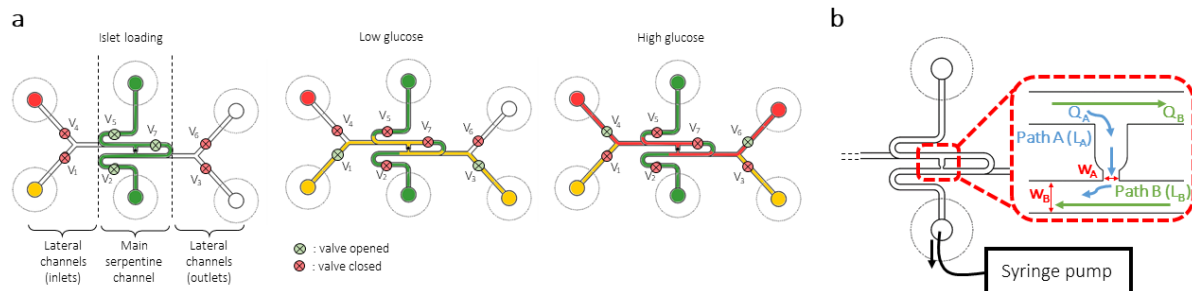


Fig. 1 Glucose stimulated insulin secretion (GSIS) on-chip microfluidic architecture. a. Schematic diagram showing an overview of the GSIS assay on-chip protocol using a serpentine microfluidic architecture coupled with a network of pneumatic valves. b. Top view of the microfluidic main channel. A syringe pump was connected to the outlet of the channel to introduce the different reagents. Close-up on the U-cup shaped islet trap based on a hydrodynamic resistance difference between two possible flow paths (inset).

Computational simulation of flow dynamics and shear stress

Fluid flow in the main serpentine channel was modelled with COMSOL Multiphysics 5.4 (COMSOL, Burlington, MA, USA) using the laminar flow module. The 3D geometry was imported from Solidworks, and a block was placed in the channel to mimic the valve forcing the flow through the U-cup trap. Islet porosity was omitted and the islet was represented by a solid sphere resting on the walls of the trap site. The properties of water were assigned to the fluid flowing at $Q = 2.5 \mu\text{L}/\text{min}$ in the microchannel. A fine physics-controlled mesh was used for a stationary analysis. Shear stress on the islet surface was calculated for a $300 \mu\text{m}$ diameter islet as the product of the dynamic viscosity and the shear rate $\tau = \mu \Delta \vec{v}$.

Insulin quantification

Insulin concentrations were measured from culture supernatants collected during the GSIS assay, using the STELLUX[®] Chemiluminescence Human Insulin ELISA (ALPCO) assay and the Tecan (Magellan) plate reader. Each sample was measured in duplicate. A stimulation index was obtained by calculating = $[\text{HGS}]/[\text{LGS}]$.

Islet viability

The viability of the islets was determined after GSIS assay by a 15 min incubation in SYTO13 solution (final concentration = $2.5 \mu\text{M}$) followed by a 5 min incubation in Propidium Iodide (PI) solution (final concentration = $10 \mu\text{g}/\text{ml}$). Confocal z-stacks of the stained individual islets were taken and flattened in ImageJ to a 2D maximum intensity projection. The quantification of the nuclei of SYTO13- labelled live cells and the nuclei of PI-labelled dead cells allowed to assess the islet viability as follows: $\text{cell viability}(\%) = (\text{number of green nuclei}) / (\text{number of green} + \text{red nuclei}) * 100$.

Imaging

Movies of fluorescent microbeads (Thermo Fisher Scientific Fluoro-Max Fluorescent Beads) infusion were taken at 15 Hz on an inverted IX50 microscope equipped with a CCD camera interfaced with Point Grey Software. Image processing was conducted using ImageJ (National Institute of Health, New York, NY, USA), codes are available on request.

Chip design and fabrication

In this study, we used hybrid microfluidic chips comprised of two or polymer layers and a stretchable membrane.

For glucose stimulated insulin secretion (GSIS) assays on-chip, we fabricated the microfluidic chip with a fluidic layer (F) and a pneumatic layer (P) enclosing the hyper-elastic membrane (Fig. 2a). Here, the pancreatic islet as well as the different reagents required for the GSIS assays flowed into the microchannels of the fluidic layer. Channels were micromachined in the pneumatic layer and positioned at different locations in the microfluidic circuit to create a valve network (Fig. 4a). These pneumatic channels were connected to a pressure source to push the membrane toward the fluidic channels. This enabled to open or close the fluidic channels at seven locations in the circuit functioning as valves. The valves were considered opened when no pressure was applied (P_A), partly closed (or leaky) when an intermediate pressure P_I was applied and closed when a pressure above the critical pressure P_C required to deform the membrane by the height H of the fluidic channel was applied (Fig. 2b). Importantly, because the Ecoflex is a gas permeable material, the pneumatic channels were filled with liquid (PBS) prior the experiments to avoid the formation of bubbles in the fluidic channels when the valves were actuated. Finally, to ensure the tightness of the valves, the fluidic channels were machined with a round milling cutter to form hemicylindrical channels so that the membrane can perfectly match their shape. Pneumatic channels were machined to a depth and width of 200 μm . They were connected to the pressure controller via standard luer ports and the membrane was pierced with a needle at these specific areas to allow the air to flow toward the microchannels. Fluidic channels dimensions were 400 μm or 200 μm in height and 400 μm in width, and were connected to the syringe-pump via standard luers ports.

To characterize the behavior of the hyper-elastic membrane when embedded in the microfluidic chip, experiments were conducted on a chip manufactured as previously described, comprising a set of elementary chambers whose volumes were controllable. Hemispherical chambers were micromachined on the P layer, as well as microchannels communicating with the valves and hemispherical chambers. This layer was placed facing the F layer covered by the membrane. Microchannels allowing communication with the stretchable chambers and the fluidic inlets and outlets, were micromachined on the F layer.

The microfluidic chips were designed using Solidworks software. Layers dimensions were credit card format (85.6 x 54 mm). With the aim of scalable manufacturing, microfluidic patterns were directly machined in a Cyclic Olefin Copolymer (COC) sheet (TOPAS, US) using a DATRON M7HP equipment (DATRON, GE), a material suitable for industrial production²⁹.

The elastic membrane was fabricated by spin coating Ecoflex 00-50 (Smooth on, US) on a silanized silicon wafer at 3000 rpm for 6.5 seconds, resulting in a $\approx 150 \mu\text{m}$ thick Ecoflex layer. This bi-component silicone material withstands larger deformations than PDMS, exhibiting a Young's modulus around 200 kPa and a maximal stretching ratio before breaking of 980%. The membrane was plasma-bonded to the pneumatic and fluidic layers and fluidic layers following a protocol adapted from COC - PDMS bonding³⁰. Prior to bonding, the surfaces of COC polymers were cleaned with ethanol, rinsed in water and dried. The surfaces of the pneumatic and fluidic layers were activated by oxygen plasma and silanized by a 30 min immersion in a 2% 3-amino-propyl-triethoxy-silane (APTES) solution. The layers were then thoroughly rinsed in water and dried. The plasma activated Ecoflex was laminated on the

pneumatic level, before being covered by the fluidic level. Finally, the assembly was press-sealed for 15 minutes (Supplementary Fig. 1).

Modelling of the hyper-elastic membrane deformation

The stress-deformation relation that was used here to describe the hyper-elastic membrane characteristics is the one derived from the Yeoh's model³¹, a higher-order extension of the neo-Hookean law, commonly employed for incompressible, nonlinear elastic materials such as Ecoflex. To evaluate the validity of the model in our configuration and to determine the pressure levels required to activate the membrane until it obstructs the fluidic channels, experiments were conducted. In these studies, the mode of deformation being equibiaxial, the elongations λ_1 , λ_2 and λ_3 in the main directions of space have been simplified to $\lambda_1 = \lambda_2 = \lambda$ and $\lambda_3 = \lambda^{-2}$. The expression of the mechanical stress was thus given by³²:

$$\sigma_Y = 2 \left(\lambda^2 - \frac{1}{\lambda^4} \right) \left(c_1 + 2 c_2 \left(2\lambda^2 + \frac{1}{\lambda^4} - 3 \right) + 3 c_3 \left(2\lambda^2 + \frac{1}{\lambda^4} - 3 \right)^2 \right)$$

In these relations, the C_i are constants specific to each material. In the case of Ecoflex 00-50, $C_1 = 19000$ Pa, $C_2 = 900$ Pa and $C_3 = -4.75$ Pa³³.

The results were then processed in a simplified way using by analogy the Laplace formula $\Delta P = \frac{2\sigma}{R} = \frac{2e\sigma_Y}{R}$ (Fig. 2b inset), where $e\sigma_Y$ plays the role of the surface tension, e being the membrane thickness. The elongation $\lambda = \frac{R\theta}{2r}$ was expressed as a function of r and h using geometrical arguments³⁴ (see Supplementary Note 2 for details). The satisfactory results have subsequently allowed to apply this model to the GSIS assay chip to estimate the pressures that would guarantee the tightness of the valves.

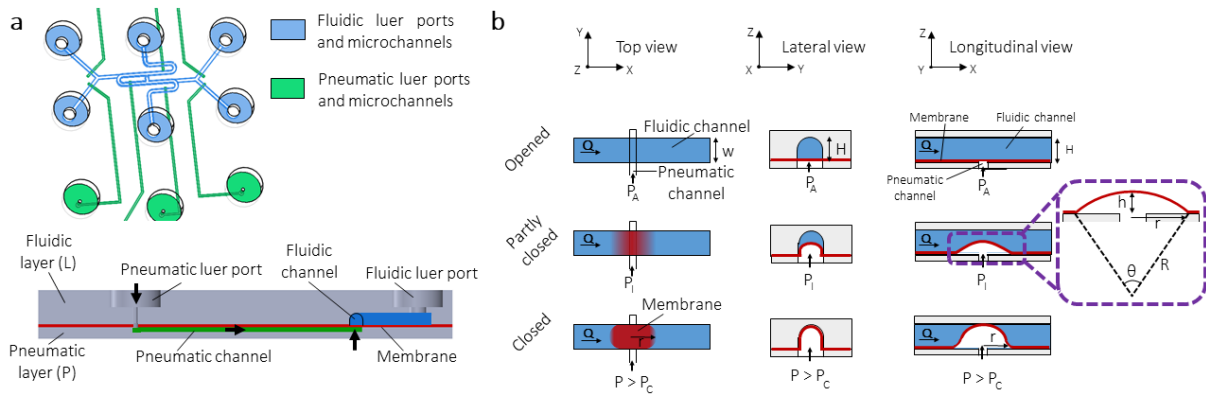


Fig. 2 Overview of the operation principle of the hyper-elastic membrane. a. Solidworks 3D view (top) of the microfluidic chip, consisting of a hyper-elastic membrane enclosed between a fluidic layer and a pneumatic layer, and sectional view (bottom) showing the path taken to deform the membrane (black arrows). b. Schematic sectional views of the integrated hyper-elastic valves on-chip in the three possible states (opened, partly closed, closed).

Results and discussion

Modelling the hyper-elastic membrane

To make the microfluidic valve network compatible with the size of the islets (ranging from 50 μm to 500 μm), another material than PDMS must be considered as it exhibits too low deformation rates. As a matter of fact, for the valves to be operative, the membrane must be deformed by the height of the channel, which itself must be larger than the pancreatic islets in order not to squeeze them. The high elasticity of the Ecoflex material allows very low actuation pressures, which is a real advantage in terms of simplification of the instrumentation and integration. However, the study of the deformation of such a material is classically carried out using blowing tests, but these do not correspond to our experimental on-chip configuration. Indeed, since Ecoflex is a flexible material, it is possible to have slippage when embedding it in the microfluidic chip. Moreover, before closing the microfluidic cards on the Ecoflex, the latter is pre-stressed for an optimal rolling process. It is therefore difficult to know if the results of a classical blowing test are still valid in such a device. Thus, a characterization of the membrane deformation directly on the microfluidic chip was necessary. To accurately study the behaviour of the membrane, we chose a hemispherical deformation model, which can easily be adapted to describe valve closure in the GSIS assay chip. The results of experiments measuring stress-strain relationships for soft materials have long shown that the linear theory of elasticity, in particular Hooke's law used since the 17th century, was inappropriate for characterizing new materials with high elongation rates^{35,36}. A new theory, which has given rise to various models, is based on a strain energy density function³⁷. We examined if the Yeoh law was able to describe our experimental configuration.

The experiment was conducted on the dedicated microfluidic chip consisting of a chamber fed by a capillary connected to a pressure controller (Fig. 3a). A valve was kept closed downstream during the filling of the chamber. The aim of the experiment was to measure the volume of liquid injected under the membrane for a given pressure. To do so, a camera filmed the advancement of the meniscus formed by the liquid in the capillary according to the pressure imposed by the pressure controller. A pressure was applied at the entrance of the tube by the pressure controller and increased by steps of 10 mbar while the advancement of the meniscus was measured at each step. The chamber was left at atmospheric pressure P_A and the valve downstream of the chamber was kept closed, pressurized to $P_+ = 500$ mbar (Fig. 3b). By measuring a relationship between the volume of liquid injected into the chamber and the pressure imposed by the pressure controller was thus found (Fig. 3c). Experiments were conducted on chambers of 30 μL volumes and 200 μL , for pressures ranging from 0 mbar to 70 mbar and 150 mbar respectively. Fig. 3d shows a strong agreement between theoretical and experimental curves, thus validating our model of deformation of the membrane in the microfluidic chip.

Together, these results demonstrate the possibility to operate the presented microfluidic device with low pressures (< 1 bar), as well as the relevance of using the Yeoh hyper-elastic material model to describe the deformation of the membrane. The ability to close the valves continuously could be of a great interest for many applications in order to precisely control the fluxes in the different branches of microfluidic circuits.

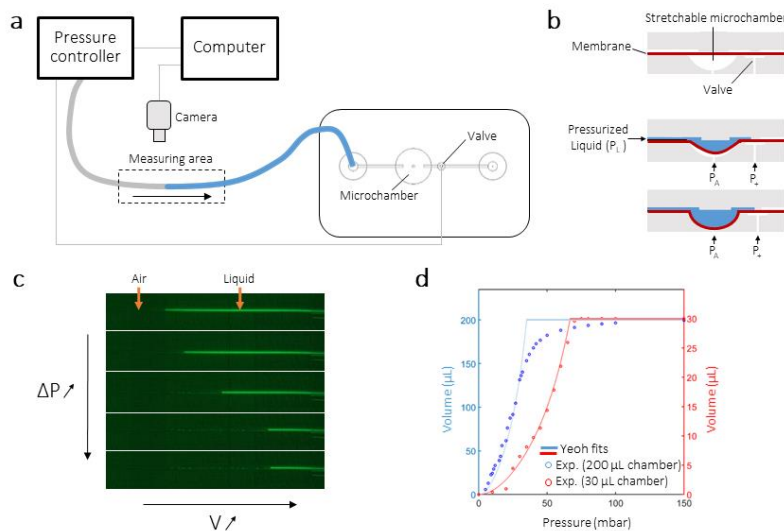


Fig. 3 Determination of the volume of a stretchable microchamber. a. Schematic diagram of the experimental set-up. b. Schematic sectional view of the microchamber. The hyper-elastic membrane was stretched to its maximum capacity defined by the milling of the pneumatic layer. c. Measurement of the meniscus advancement as the pressure was increased using the pressure controller. d. Relationship between the volume of liquid injected in the microchamber and the pressure imposed by the pressure controller: comparison of the experimental results with the experimental results with the Yeoh law.

Valves validation for islets perfusion microfluidic chip

We used this model to size the valves and microchannels of a microfluidic chip dedicated to human pancreatic islets perfusion (Fig. 4a). We designed a microfluidic chip with hemicylindrical shaped microchannels of 400 μm in width and 400 μm (main channel) or 200 μm (lateral channels) in height. The aim here was to establish the orders of magnitude of pressure required to deform the membrane by the height of such microchannels. In the presented configuration, the deformation of the membrane no longer had the shape of a symmetric spherical cap because it was laterally trapped by the fluidic microchannel walls. Nevertheless, the use of the Yeoh law was supported by the fact that a small local delamination was observed at the valves after multiple actuations at 1 bar, allowing a deformation approximated by a portion of circle of radius r (of about the height of the fluidic channel) in the longitudinal plane and of radius $r/2$ and in the lateral plane (Fig. 2b).

To determine the tightness thresholds of the valves experimentally, infusion of fluorescent microbeads (at $Q = 10 \mu\text{L}/\text{min}$) were recorded at different locations of the microfluidic channels (Fig. 4b). The valves were actuated at different pneumatic pressures P_p and the movements of the microbeads were recorded for each pressure step. The tightness of the valves was assessed at the pressure where the beads stopped moving. To do this, the consecutive frames from the raw films were subtracted using ImageJ, followed by a maximum intensity projection over 5 frames to highlight only the moving microbeads. Thus, the fluxes in microchannels were visualized by the white tracks left by the flowing microbeads, and no intensity signal were resulting from areas where the microbeads were motionless. Experiments were done with 3 valves (V_7 , V_2 and V_3) on 4 different microfluidic chips with similar results, and results for valves V_7 and V_2 are shown as examples in Fig. 4c. For the valve V_7 , when the valve was opened, the beads followed both path A and B. When the valve was partly opened, the beads were still flowing through path A and B, but the flow rate in path B decreased while the flow rate in path A intensified. When the valve was tightly closed, the beads flowed only through path A (Fig. 4c, top). For the valve V_2 , since there was only one possible path, the microbeads flowed along the channel for a pressure lower than the threshold pressure, and stopped flowing after the valve actuation for a pressure higher than the threshold pressure (Fig. 4c, bottom). The white arrows in the figures recapitulate qualitatively the direction of flow in each case.

Therefore, experiments showed tightness thresholds of 500 mbar for the main serpentine channel 400 μm deep (V_7 and V_2) and 350 mbar for the 200 μm deep lateral channels (V_3). When applied to this configuration, the Yeoh deformation model guaranteed the tightness of the valves with working pressures above 400 mbar for the valves located in the main channel and above 250 mbar for the valves located in the lateral channels (Fig. 4d). The discrepancy between the thresholds given by the model and the experimental ones can be attributed to the fact that the complete sealing of the valves occurs at a pressure slightly higher than that the one required to deform the membrane by the exact maximum channel height. Moreover, the tightness thresholds also depend on the flow rate and the exact thickness of the membrane. For these reasons, we preferred to work with a margin ensuring the tightness of the valves under experimental conditions. These valves can be activated a large number of times without any aging being noticed. Together, these results confirmed the proper functioning of the microfluidic set-up with pressures below 1 bar.

This design resolves many conventional limitations: (1) the ability to automatically isolate and capture individual islet with the serpentine hydrodynamic trapping, (2) sufficient oxygen and dynamic glucose delivery due to continuous microfluidic perfusion, (3) detectable insulin output due to low dead volumes and flow rates. Moreover, with the hyper-elastic behavior of the membrane, the valves exhibited sufficiently large deformations to be directly integrated into the fluidic channels, without deforming the islet nor resorting to complex manufacturing methods. When opened, the valves did not induce any pressure loss in the channels. On the other hand, the valves can be closed in a perfectly tight way with pressures lower than 1 bar. Finally, using our model, the pneumatic pressure could be regulated to induce controlled flow rates in the different pathways.

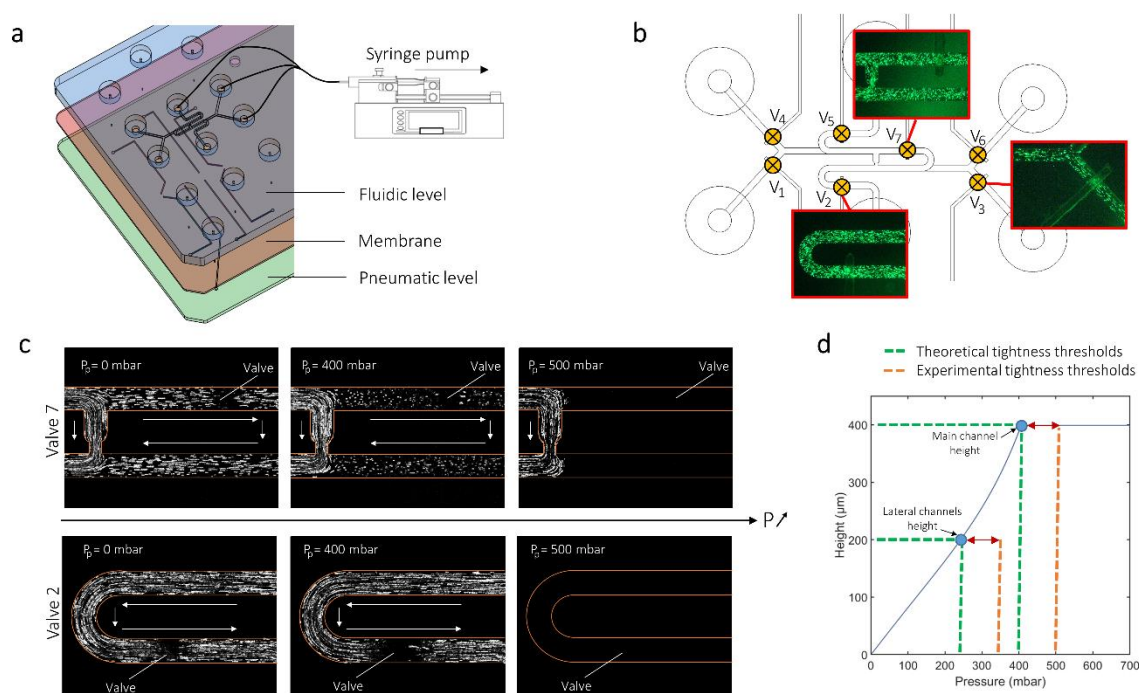


Fig. 4 Valves validation in the GSIS assay chip. a. Solidworks 3D exploded view of the GSIS assay microfluidic chip. b. Top view of the fluidic microchannels and the locations of the valves. Fluorescent microbeads infusion were recorded around V_7 , V_2 and V_3 (red insets). c. Z-projection of maximum intensity over a 5 images stack, highlighting the tracks of the microbeads flowing through the microchannels. The stack was obtained after an image subtraction process. d. Comparison of the valves tightness pressure thresholds obtained experimentally and predicted by the Yeoh model.

Islets trapping and associated shear stresses

To determine the shear stress imposed to the islet during the GSIS-assay protocol, the flow in the main serpentine channel was modeled using COMSOL Multiphysics. While it has already been shown that microfluidic continuous perfusion positively affects islets function and survival³⁸, too high shear stress can cause cell deformation and lead to permanent damage³⁹. To model our experimental conditions, atmospheric pressure was assigned at the inlet wall and a flow rate of 100 $\mu\text{L}/\text{min}$ or 2.5 $\mu\text{L}/\text{min}$ was assigned at the outlet (Fig. 5a). Indeed, the islet has to be trapped quickly at first, both to avoid sedimentation in the inlet reservoir and to allow rapid trapping. The flow rate was then reduced for the secretions phases to ensure adequate sensitivity. In both cases, the islet should not experience a too high shear stress. The valve forcing the flow toward the U-cup trap was represented by a solid block which does not allow any flow in the loop channel (path B) when activated. As described in previous studies^{21,22}, when the valve was not actuated, the majority of the fluid flowed through path B, thus protecting the islet from shear stress (Fig. 5b). When the valve was closed (corresponding to low and high glucose stimulations), the flow was forced through path A. However, because the flow rate was significantly decreased, the associated shear stress was found one order of magnitude lower compared to the opened valve configuration (Fig. 5c). The shear values predicted on the periphery of the islet were well below the ones of > 10 Pa usually considered to cause mechanical damage⁴⁰ (Fig. 5d). A more refined analysis would have to take into account the deformability of the islet as well as its porosity, but we have sought here to establish orders of magnitude. Together, these results indicate that the islet was not subjected to problematic shear stress values during the GSIS on-chip assay. Of note, the flow rate can be continuously controlled in the loop channel (path B) thanks to the hyper-elastic membrane, so the shear stress applied to the islet can be monitored as well.

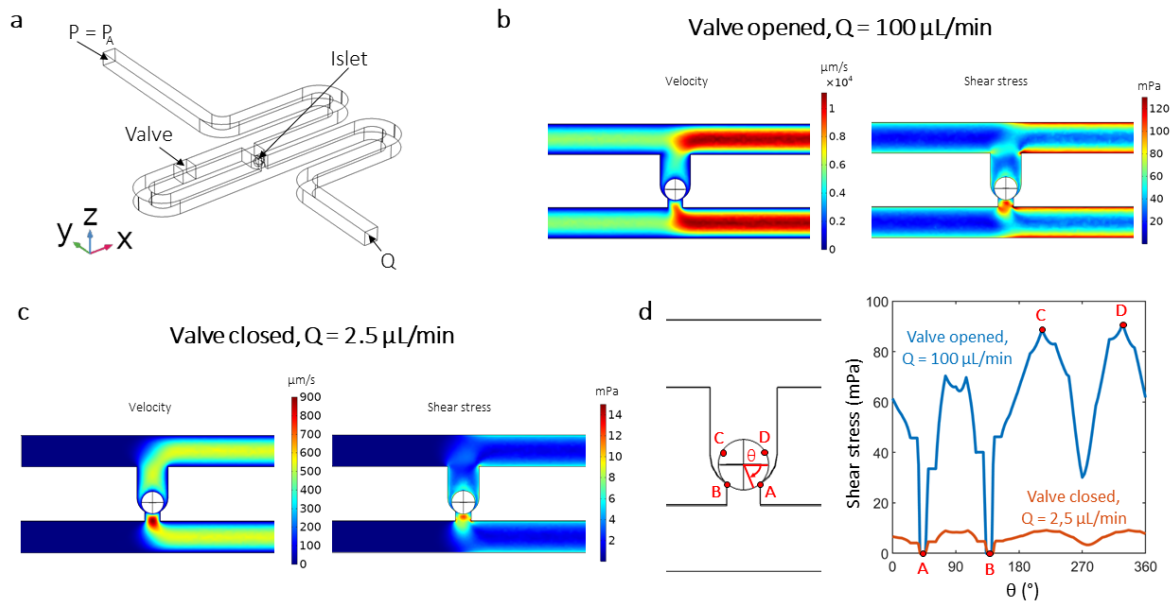


Fig.5 Examination of the shear stress inflicted on the islet during the GSIS assay using Comsol. a. Comsol 3D rendering of the serpentine-shaped microchannel with initial boundary conditions. b-c. Velocity and shear stress fields along the median plane of the channel near the trap site with the valve opened (b) or closed (c). d. Shear stress along the circumference line of the islet.

Fluidic protocol validation and islet perfusion

To validate the fluidic functioning of our microfluidic device, we performed experiments using food colorings diluted in KREBS buffer. The different possible paths for the liquid were thus visualized in white (initial filling), green (islet trapping), yellow (low glucose) and red (high glucose). In the following, for the sake of clarity, we will refer to the colored model solutions as LGS, HGS and islet retrieval respectively, in relation to the corresponding steps of the protocol in real conditions.

The experimental set-up consisted of the microfluidic chip connected to a syringe-pump *via* its three outlets. The chip was placed into a thermostatic chamber with a beaker of water to avoid evaporation. The valves were actuated with a pressure controller connected to the pneumatic luers ports of the chip and to a computer (Fig. 6a and Supplementary Fig. 2). The valve operation protocol was achieved using a pneumatic valve controller (LineUp P-Switch, Fluigent) connected to a pressure controller (Flow-EZ, Fluigent) and interfaced with Microfluidic Automation Tool Software (Fluigent) to fully automate the GSIS test experiments, by programming the pressurization sequence of each of the seven pneumatic microchannels during the whole experiment. Three tubings of the same length were connected to a single syringe on the syringe-pump via a T-junction tubing connector. The liquid was directed into tubing (1), (2), or (3) whether the valve V2, V3 or V6 was opened respectively (Fig 6.b). The choice of the syringe-pump was motivated by the desire to control the flow rate rather than the pressure. Indeed, during a GSIS experiment, insulin was collected in a given volume secreted by the islet during a given time interval.

First, the microchannels were filled with buffer solution by capillarity. The valves V3 and V6 were closed during this process to keep the outlets clear from any liquid, all the other valves being opened (Fig. 6c.1). A human islet, obtained from a cadaveric donor, was added with a pipet into the islet loading reservoir and was flowed into the microchannel at $Q = 100 \mu\text{L}/\text{min}$ through the main path (to tubing 1), the valves V1, V3, V4 and V6 being closed and V2, V5 and V7 opened. It was trapped according to the hydrodynamic principle described above. The pre-incubation phase was performed through the perfusion of LGS into the main serpentine channel using the same valve configuration *i.e.* V1, V3, V4 and V6 closed and V2, V5 and V7 opened (Fig. 6c.2). For low glucose stimulation, because once the islet was trapped, $Q_B > Q_A$, the flow was preferentially through the path B. Thus, the valve V7 was closed to force the flow through the path A to collect the secretions of the islet without being too diluted. The valves V4 and V6 were kept closed while V2 and V5 from the serpentine channel were closed. V1 and V3 were opened to achieve low glucose stimulation and supernatant collection (Fig. 6c.3). The LGS sample was collected in tubing 2. In the same way, high glucose stimulation and supernatant collection required the closing of valves V1 and V3 and the opening of V4 and V6 (Fig. 6c 4). V2, V5 and V7 were kept closed. The HGS was collected in tubing 3. At the end of the GSIS test, the islet can be retrieved for further cell culture or other assays (e.g. examination of its viability or total insulin content). To do so, the valves V1, V3, V4, V6 and V7 were closed while V2 and V5 were opened. The islet was thus pushed towards the islet reservoir using the syringe-pump in its infusion mode. All the steps of the protocol with corresponding valves openings and closings are given in Table 1.

	V1	V2	V3	V4	V5	V6	V7	Q ($\mu\text{L}/\text{min}$)
Initial filling	O	O	C	O	O	C	O	/
Islet loading	C	O	C	C	O	C	O	100
Pre-incubation (phase 1)	C	O	C	C	O	C	O	2.5
Low glucose (phase 2)	O	C	O	C	C	C	C	2.5
High glucose (phase 3)	C	C	C	O	C	O	C	2.5
Islet retrieval	C	O	C	C	O	C	C	2.5

Table 1: Sum-up of the valves openings and closing during the whole protocol. O = Opened, C = Closed.

We proposed a biological validation of our device using human pancreatic islets. A reproducible loading of pancreatic islet into the microfluidic chip was successfully achieved *via* syringe-pump driven flow, at the flow rate of $Q = 100 \mu\text{L}/\text{min}$. As described in the sections above, an islet was precisely positioned at the trap sites without any apparent deformation, thus demonstrating a soft trapping mechanism.

To validate the functionality of the islet on-chip, we adapted the conventional static culture Glucose Stimulated Insulin Secretion (GSIS) assay to the perfusion conditions of the microfluidic system by first infusing at $Q = 2.5 \mu\text{L}/\text{min}$ the microchannels as described below, with 2.8 mM glucose solution for 1 h (pre-incubation phase), followed by a 1 h of perfusion with 2.8 mM glucose solution (low glucose stimulation) and a 1 h perfusion with 16.7 mM glucose solution (high glucose stimulation). For each islet, the perfused supernatants were collected in the tubing connected to the exit ports for low and high glucose conditions, resulting in two 150 μL samples (low and high glucose) for further ELISA analysis. The insulin secreted by the islet on-chip increased significantly from the first incubation of the low glucose condition to the high glucose condition. Pancreatic islets obtained from InSphero (donor 1) showed a stimulation index (SI) of 2.8 ± 0.9 and 2.4 ± 0.7 in static and on-chip conditions respectively (mean \pm sd, $n=8$ for each condition). Pancreatic islets obtained from Montpellier Hospital (donor 2) showed a SI of 1.5 ± 0.7 and 1.4 ± 0.4 in static and on-chip conditions respectively (mean \pm sd, $n=3$ for each condition). Overall, the SI results were similar between both the static cultures and the on-chip experiments, thus validating that glucose response from the islets was not impaired in our microfluidic device (Fig. 6d). Moreover, SI above 1 demonstrate the correct functionality of islets, and therefore that the Ecoflex does not induce toxicity. Although this last point has already been proven in various studies⁴¹⁻⁴³, we performed viability tests to ensure the non-toxicity of our device and protocol on the pancreatic islets. Viability tests were conducted after GSIS assay in well ($n=4$ individual islets, donor 1) and on-chip ($n=3$ individual islets, donor 1) *via* SYTO13 and Propidium Iodide (PI) double staining (Fig. 6e). Viability remained above 90% after GSIS assay in both static and on-chip conditions, with no significant difference found between the two conditions. This also proves the biocompatibility of our device.

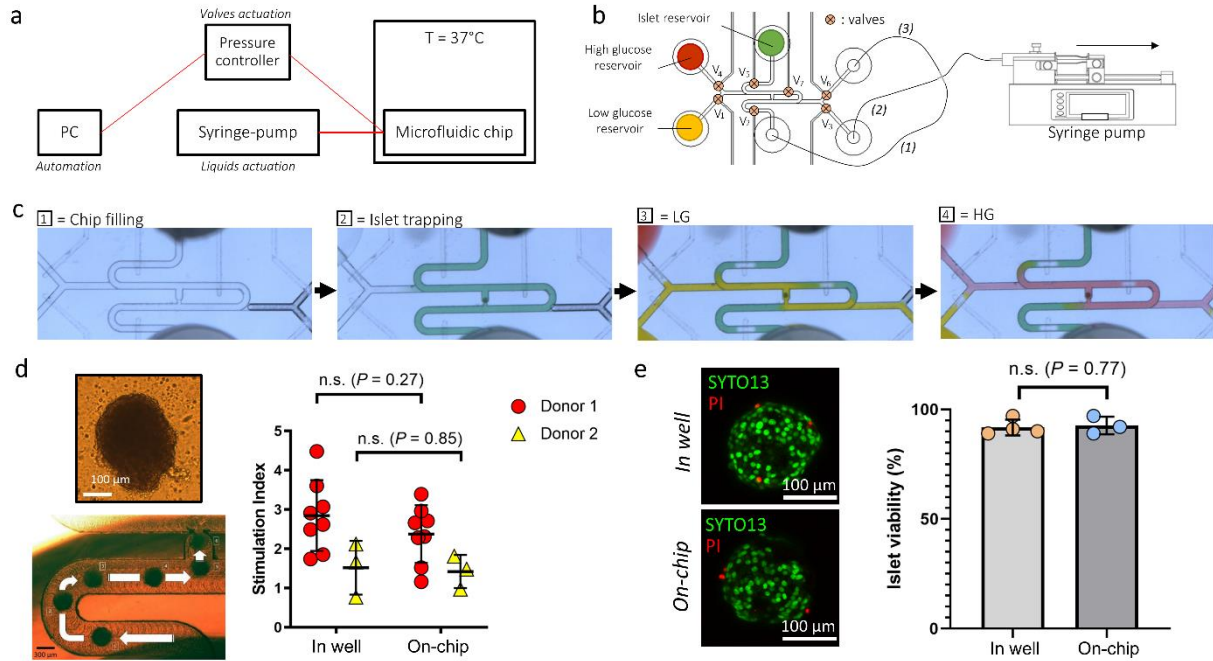


Fig.6 GSIS assay on-chip. a. Schematic diagram of the experimental set-up. b. Liquid actuation principle: the different reagents were introduced into the microfluidic chip using a syringe pump functioning in its withdrawal mode. The network of valves, connected to a pressure controller, allowed to direct the liquids towards different flow paths. c. Fluidic validation of the GSIS assay protocol using colored solutions: initial chip filling (1), islet loading (2), low glucose stimulation and collect (3), high glucose stimulation and collect (4). d. Representative image of the human islet obtained from cadaveric donor that is trapped (left) and comparison of the stimulation index between static (in well) and dynamic (on-chip) conditions. Each point on the graph represents the stimulation index of one pancreatic islet obtained from the measure of two samples (low and high glucose). e. Confocal z-stack maximum intensity projection renderings of a single islet stained for SYTO13 and PI after GSIS assay (left, images are representative of $n=4$ and $n=3$ islets tested in static and dynamic conditions respectively). Comparison of islet viability after GSIS assay in well or on-chip (right) Each point on the graph corresponds to one pancreatic islet. Results are shown as mean \pm s.d. Unpaired t-test (two-tailed) for comparisons was conducted using GraphPad Prism 9 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

All together, these results demonstrate the ability of the presented microfluidic device to direct fluxes easily using a network of valves that can be integrated in the fluidic circuit. The device we developed has the advantage of enabling to perform a GSIS assay on one single islet on-chip with similar results to the classical static conditions. The islet trapping function in the device allows an automatic positioning of the islet, but also, by reversing the direction of the flow, allows to retrieve the islet for offline analysis after on-chip experiments. Compared to conventional methods where numerous manual operations are needed, our microfluidic platform allows to perform a GSIS assay in a fully automated way without requiring complex technical settings. In addition, because a microfluidic approach generates very low dead volumes, insulin secretion kinetics of individual islet could be determined by collecting samples at short time intervals. Regenerative medicine with islet transplantation, a cell therapy for diabetes, has emerged for a decade as a promising effective treatment to restore good glycaemic control in insulin independent diabetic patients with severe form of diabetes⁴⁴. The device we present here could help to quickly test and sort the best islets before transplantation. It has already been shown that this serpentine architecture can be parallelized to trap tens of islets²⁴, thus our device could be easily adapted for higher throughput for applications requiring it. Finally, this microfluidic platform can be used for diverse biological assays and should enable the analysis of diverse secretomes. While the presented device does not embed insulin sensing on-chip yet, this hyper-elastic membrane based technology has already been proven reliable

for quantitative biological assays in one of our previous works⁴⁵. Some investigations are ongoing in our labs to address this and to develop a fully automated and integrated microfluidic platform for the assessment of pancreatic islets function.

Conclusions

In this paper, we present a new microfluidic platform that provides straightforward solutions to overcome the limitations often encountered with conventional pancreatic islets perfusion systems. Managing to decrease the number of pancreatic islets down to one islet and the ease of use of our device is of great interest for clinical use. Indeed, our device could enable an extra delivery criteria for grafting pancreatic islets to patients. The trapping of individual islets as well as the temporal and spatial control of the fluxes were automated through a network of hyper-elastic valves easy to integrate on-chip. Moreover, the chip was manufactured in COC for scalable manufacturing purposes. By altering the number or the arrangement of lateral microchannels, one can customize the device for a wide range of biological assays. The microfluidic chip can be improved by integrating in series either the U-cup shaped trap to experiment on a pool of several islets, or the whole unit presented here to study individual islets at a higher throughput. Of note, parallelizing the traps while varying their dimensions can be of interest to sort islets by size. Also, integrating a readout on-chip such as an ELISA for insulin sensing⁵ or other micro-sensors⁴⁶ would be particularly beneficial. Moreover, to reduce the footprint of the overall device, the syringe pump could be replaced by a peristaltic pump on-chip functioning on the principle of the stretchable membrane. Finally, this work is part of a more general framework in which microphysiological systems can incorporate a higher physiological relevance compared to static cultures, such as a functional vasculature⁴⁷. These model systems will benefit from being handled with microfluidic techniques, which allow a more direct access to the biological tissues and a precise control of the stimuli.

Author Contributions

Conceptualization: C. Q., Y. F., F. N., X. G., methodology: C. Q., Y. F., X. G., project administration: F.N, X.G., validation: C.Q., E.T., J-L. A., Y.F., X.G., investigation: C. Q., E. T. formal analysis: C. Q., E. T., writing original draft: C.Q., writing review & editing: Y. F., E.T., J-L. A., F.N, X. G. Supervision: Y. F., J-L. A., F.N, X. G., funding acquisition: F. N., Y. F., X. G.

Acknowledgements

We thank F.Boizot and M.Alessio for the manufacturing of microfluidic chips. We thank the French Carnot Institute and CEA for funding.

References

1. Rothbauer, M., Zirath, H. & Ertl, P. Recent advances in microfluidic technologies for cell-to-cell interaction studies. *Lab. Chip* **18**, 249–270 (2018).
2. Jung Kim, M., Chul Lee, S., Pal, S., Han, E. & Myong Song, J. High-content screening of drug -induced cardiotoxicity using quantitative single cell imaging cytometry on microfluidic device. *Lab. Chip* **11**, 104–114 (2011).
3. Yang, X. *et al.* Nanofiber membrane supported lung-on-a-chip microdevice for anti-cancer drug testing. *Lab. Chip* **18**, 486–495 (2018).
4. Sayad, A. A. *et al.* A microfluidic lab-on-a-disc integrated loop mediated isothermal amplification for foodborne pathogen detection. *Sens. Actuators B Chem. C*, 600–609 (2016).
5. Gliberman, A. L. *et al.* Synchronized stimulation and continuous insulin sensing in a microfluidic human Islet on a Chip designed for scalable manufacturing. *Lab. Chip* **19**, 2993–3010 (2019).
6. Nourmohammadzadeh, M. *et al.* A microfluidic array for real-time live-cell imaging of human and rodent pancreatic islets. *Lab. Chip* **16**, 1466–1472 (2016).
7. Xing, Y. *et al.* A pumpless microfluidic device driven by surface tension for pancreatic islet analysis. *Biomed. Microdevices* **18**, 80 (2016).
8. Shaikh Mohammed, J., Wang, Y., A. Harvat, T., Oberholzer, J. & T. Eddington, D. Microfluidic device for multimodal characterization of pancreatic islets. *Lab. Chip* **9**, 97–106 (2009).
9. Schulze, T. *et al.* A 3D microfluidic perfusion system made from glass for multiparametric analysis of stimulus-secretioncoupling in pancreatic islets. *Biomed. Microdevices* **19**, 47 (2017).
10. Misun, P. M. *et al.* In Vitro Platform for Studying Human Insulin Release Dynamics of Single Pancreatic Islet Microtissues at High Resolution. *Adv. Biosyst.* **4**, 1900291 (2020).
11. Dishinger, J. F., Reid, K. R. & Kennedy, R. T. Quantitative Monitoring of Insulin Secretion from Single Islets of Langerhans in Parallel on a Microfluidic Chip. *Anal. Chem.* **81**, 3119–3127 (2009).
12. Yi, L. *et al.* Integrated perfusion and separation systems for entrainment of insulin secretion from islets of Langerhans. *Lab. Chip* **15**, 823–832 (2015).
13. Godwin, L. A. *et al.* Passively Operated Microfluidic Device for Stimulation and Secretion Sampling of Single Pancreatic Islets. *Anal. Chem.* **83**, 7166–7172 (2011).
14. Bandak, B., Yi, L. & G. Roper, M. Microfluidic-enabled quantitative measurements of insulin release dynamics from single islets of Langerhans in response to 5-palmitic acid hydroxy stearic acid. *Lab. Chip* **18**, 2873–2882 (2018).
15. Ewart, L. & Roth, A. Opportunities and challenges with microphysiological systems: a pharma end-user perspective. *Nat. Rev. Drug Discov.* **20**, 327–328 (2021).
16. Rafael Castiello, F., Heileman, K. & Tabrizian, M. Microfluidic perfusion systems for secretion fingerprint analysis of pancreatic islets: applications, challenges and opportunities. *Lab. Chip* **16**, 409–431 (2016).
17. Munaz, A., K. Vadivelu, R., St John, J. A. & Nguyen, N.-T. A lab-on-a-chip device for investigating the fusion process of olfactory ensheathing cell spheroids. *Lab. Chip* **16**, 2946–2954 (2016).
18. Astolfi, M. *et al.* Micro-dissected tumor tissues on chip: an ex vivo method for drug testing and personalized therapy. *Lab. Chip* **16**, 312–325 (2016).
19. Ota, H., Kodama, T. & Miki, N. Rapid formation of size-controlled three dimensional hetero-cell aggregates using micro-rotation flow for spheroid study. *Biomicrofluidics* **5**, 034105 (2011).
20. Tan, W.-H. & Takeuchi, S. A trap-and-release integrated microfluidic system for dynamic microarray applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**, 1146–1151 (2007).
21. Nourmohammadzadeh, M. *et al.* Microfluidic Array with Integrated Oxygenation Control for Real-Time Live-Cell Imaging: Effect of Hypoxia on Physiology of Microencapsulated Pancreatic Islets. *Anal. Chem.* **85**, 11240–11249 (2013).
22. Silva, P. N., Green, B. J., Altamentova, S. M. & Rocheleau, J. V. A microfluidic device designed to induce media flow throughout pancreatic islets while limiting shear-induced damage. *Lab. Chip* **13**, 4374–4384 (2013).
23. Ruppen, J. *et al.* A microfluidic platform for chemoresistive testing of multicellular pleural cancer spheroids. *Lab. Chip* **14**, 1198–1205 (2014).
24. Zbinden, A. *et al.* Non-invasive marker-independent high content analysis of a microphysiological human pancreas-on-a-chip model. *Matrix Biol.* **85–86**, 205–220 (2020).
25. Thorsen, T., Maerkl, S. J. & Quake, S. R. Microfluidic Large-Scale Integration. *Science* **298**, 580–584 (2002).
26. Oh, K. W. & Ahn, C. H. A review of microvalves. *J. Micromechanics Microengineering* **16**, R13–R39 (2006).
27. Zhang, M. *et al.* Highly parallel and efficient single cell mRNA sequencing with paired picoliter chambers. *Nat. Commun.* **11**, 1–13 (2020).
28. Wehner, M. *et al.* An integrated design and fabrication strategy for entirely soft, autonomous robots. *Nature* **536**, 451–455 (2016).
29. Nunes, P. S., Ohlsson, P. D., Ordeig, O. & Kutter, J. P. Cyclic olefin polymers: emerging materials for lab-on-a-chip applications. *Microfluid. Nanofluidics* **9**, 145–161 (2010).
30. Cortese, B., Mowlem, M. C. & Morgan, H. Characterisation of an irreversible bonding process for COC–COC and COC–PDMS–COC sandwich structures and application to microvalves. *Sens. Actuators B Chem.* **160**, 1473–1480 (2011).
31. Yeoh, O. H. Some Forms of the Strain Energy Function for Rubber. *Rubber Chem. Technol.* **66**, 754–771 (1993).
32. Rodríguez-Martínez, J. A., Fernández-Sáez, J. & Zaera, R. The role of constitutive relation in the stability of hyper-elastic spherical membranes subjected to dynamic inflation. *Int. J. Eng. Sci.* **93**, 31–45 (2015).

33. Xavier, M. S., Fleming, A. J. & Yong, Y. K. Finite Element Modeling of Soft Fluidic Actuators: Overview and Recent Developments. *Adv. Intell. Syst.* **3**, 2000187 (2021).
34. Quintard, C., Fouillet, Y., Parent, C., Gidrol, X. & Achard, J.-L. Expérimentation et modélisation du comportement hyperélastique d'une membrane dans une cartouche microfluidique. in *Congrès Français de Mécanique* (2019).
35. Mooney, M. A Theory of Large Elastic Deformation. *J. Appl. Phys.* **11**, 582–592 (1940).
36. Rivlin, R. S. Large Elastic Deformations of Isotropic Materials. IV. Further Developments of the General Theory. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Ser. A* **241**, 379–397 (1948).
37. Martins, P., Natal Jorge, R. M. & Ferreira, A. J. M. A comparative study of several material models for prediction of hyperelastic properties: Application to silicone-rubber and soft tissues. *Strain* **42**, 135–147 (2006).
38. Sankar, K. S. *et al.* Culturing Pancreatic Islets in Microfluidic Flow Enhances Morphology of the Associated Endothelial Cells. *PLoS ONE* **6**, (2011).
39. Klak, M. *et al.* Bionic Organs: Shear Forces Reduce Pancreatic Islet and Mammalian Cell Viability during the Process of 3D Bioprinting. *Micromachines* **12**, 304 (2021).
40. Shintaku, H. *et al.* Effects of fluid dynamic stress on fracturing of cell-aggregated tissue during purification for islets of Langerhans transplantation. *J. Phys. Appl. Phys.* **41**, 115507 (2008).
41. Luis, E. *et al.* Silicone 3D Printing: Process Optimization, Product Biocompatibility, and Reliability of Silicone Meniscus Implants. *3D Print. Addit. Manuf.* **6**, 319–332 (2019).
42. Salvatore, G. A. *et al.* Biodegradable and Highly Deformable Temperature Sensors for the Internet of Things. *Adv. Funct. Mater.* **27**, 1702390 (2017).
43. Wang, A. *et al.* Improvement of the cytocompatibility of electrospun poly[(R)-3-hydroxybutyrate-co-(R)-3-hydroxyvalerate] mats by Ecoflex. *J. Biomed. Mater. Res. A* **100A**, 1505–1511 (2012).
44. Lablanche, S. *et al.* Islet transplantation versus insulin therapy in patients with type 1 diabetes with severe hypoglycaemia or poorly controlled glycaemia after kidney transplantation (TRIMECO): a multicentre, randomised controlled trial. *Lancet Diabetes Endocrinol.* **6**, 527–537 (2018).
45. Parent, C. *et al.* Quantitative biological assays with on-chip calibration using versatile architecture and collapsible chambers. *Sens. Actuators B Chem.* **261**, 106–114 (2018).
46. Chmaysem, A. *et al.* Development of a multiparametric (bio)sensing platform for continuous monitoring of stress metabolites. *Talanta* **229**, 122275 (2021).
47. Rambøl, M. H., Han, E. & Niklason, L. E. Microvessel Network Formation and Interactions with Pancreatic Islets in Three-Dimensional Chip Cultures. *Tissue Eng. Part A* (2019) doi:10.1089/ten.tea.2019.0186.