

# MODELES 3D DE MICRO- VAISSEaux CEREBRAUX ET APPLICATIONS POUR DES TUMEURS-SUR- PUCES : DEFIS ET INTERETS DES TECHNIQUES D'HISTOLOGIE

FIGAROL Agathe <sup>\*1</sup>, MOSBAH Roumaïssa<sup>1</sup>, POUIT Marion<sup>1</sup>, CHAMOUTON Sylvain<sup>1</sup>, MATSUSAKI Michiya<sup>2</sup>, YAMADA Asuka<sup>3</sup>, FURIHATA Tomomi<sup>4</sup>, CHOLLET Franck<sup>1</sup>, LEBLOIS Thérèse<sup>1</sup>, HUMBLOT Vincent <sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Université de Franche-Comté, CNRS, institut FEMTO-ST, 25000 Besançon, France*

<sup>2</sup> *Department of Applied Chemistry, Graduate School of Engineering, Osaka University, Osaka, 565-0871, Japan*

<sup>3</sup> *Joint Research Laboratory (TOPPAN INC.) for Advanced Cell Regulatory Chemistry, Graduate School of Engineering, Osaka University, Osaka, 565-0871, Japan*

<sup>4</sup> *School of Pharmacy, Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences, Tokyo, 192-0392, Japan*

agathe.figarol@femto-st.fr  
N° ORCID 0000-0001-5121-3151

# 3D MODELS OF BRAIN MICRO-VESSELS AND APPLICATIONS FOR TUMOR-IN-CHIPS: CHALLENGES AND OPPORTUNITIES FROM HISTOTECHNOLOGY.

## ABSTRACT

The blood-brain barrier (BBB) hampers the development of innovative drugs and nanocarriers to treat neuropathologies. The fight against most common and aggressive brain tumor, the glioblastoma multiform (GBM), faces too many therapeutic failures, with a survival after diagnosis of 12 to 18 months only. The preclinical research is stuck between too simplistic *in vitro* models, and animal experimentation with ethical and inaccuracy issues due to the interspecies differences. Tissue engineering and physiological microsystems as tumor-on-chips are promising alternatives for preclinical screening of drug candidates.

The validation of these engineered *in vitro* models is largely supported by image-based assessment and external biochemical analyses. However, the scaffold materials and designs, the thickness of the embedded tissues and the microfluidic systems induce challenges that conventional microscopic and histological technologies have to overcome.

## KEYWORDS

Microfluidic, Microphysiological system, Tissue engineering, Tumor-on-chip.

## RESUME

La barrière hémato-encéphalique (BHE) freine le développement de médicaments innovants pour traiter les neuropathologies. La lutte contre la tumeur du cerveau la plus commune et la plus agressive, le glioblastome multiforme (GBM), fait ainsi face à un trop grand nombre d'échecs thérapeutiques avec une survie après diagnostic de 12 à 18 mois environ. La recherche préclinique pour le combattre est prise en étau entre des modèles *in vitro* trop simplistes et des études chez l'animal avec des problématiques éthiques et des incertitudes liées aux différences inter-espèces. L'ingénierie tissulaire et les microsystèmes physiologiques de type «organe-sur-puce» sont une piste pour le développement d'alternatives pour le criblage préclinique des candidats médicaments.

La validation de ces modèles d'ingénierie *in vitro* repose en grande partie sur l'imagerie et des analyses biochimiques externalisées. Cependant les techniques de microscopie et d'histologie conventionnelles doivent surmonter des nouveaux défis liés aux dimensions des micropuces fluidiques, aux matrices des produits issus de l'ingénierie tissulaire, à leur épaisseur, ou encore à leur encastrement.

## MOTS CLES

Ingénierie tissulaire, Microfluidique, Système microphysiologique, Tumeur-sur-micropuce.

## INTRODUCTION

Le système nerveux central est protégé des agressions extérieures par la barrière hémato-encéphalique (BHE). Elle est formée d'une superposition de 3 types cellulaires particuliers. Les cellules endothéliales cérébrales forment les parois des vaisseaux sanguins, et les péricytes et astrocytes, accompagnés de la matrice extra-cellulaire, en forment la partie basale et assurent la communication avec le reste du système nerveux. Le réseau vasculaire

cérébral, principalement constitué de capillaires sanguins, de 600 km de long et de 12 à 18 m<sup>2</sup> de surface filtre ainsi l'oxygène, le dioxygène, les nutriments, et les déchets cellulaires pour assurer la viabilité des cellules cérébrales. Il permet également l'équilibre homéostatique, mais restreint le passage de la quasi-totalité des matériaux exogènes [1]. Une ancienne publication indiquait que la BHE bloquerait l'accès au cerveau de 100% de grandes molécules pharmaceutiques et 98% des petites [2]. Même si les techniques de mesure du transport de ces molécules ont évolué, et nous permettent de revoir ces chiffres à la baisse [3], la BHE freine toujours le développement de nouvelles thérapies contre les maladies neurologiques. Les cancers du cerveau et autres maladies du système nerveux central ont malheureusement drastiquement augmenté (plus 94% entre 1990 et 2019), tandis que le taux de mortalité n'a pas connu d'amélioration significative [4]. Les patients atteints d'un glioblastome multiforme (GBM), le cancer du cerveau le plus commun, n'ont en moyenne que 12 à 18 mois d'espérance de vie après diagnostic [5]. De nouveaux traitements sont nécessaires pour palier ou suppléer aux traitements conventionnels (protocole de Stupp) qui associent chirurgie, radiothérapie et chimiothérapie à base de témozolomide [6]. Les études précliniques évaluent le transport, l'efficacité et l'innocuité des candidats médicaments sur des modèles cellulaires *in vitro* qui ne représentent pas la complexité du microenvironnement tumoral et de la BHE, ou chez l'animal en *in vivo* avec les problématiques éthiques et de transfert clinique [3, 7, 8]. Les différences inter-espèces empêchent des projections fiables chez le patient (exemple des péricytes au phénotype bien différent entre souris et humains [9]) et contribuent au taux d'échec colossal d'environ 90% des résultats du laboratoire au chevet du patient. La relation entre cellules cancéreuses de GBM et BHE est toujours mal comprise.

En parallèle de l'avancée d'autres techniques alternatives (comme les modèles *ex vivo* ou *in silico*), l'ingénierie tissulaire permet de s'affranchir de ces contraintes et de proposer des modèles humains avec microenvironnement 3D pour les tests en laboratoire. Dans des conditions adéquates, au sein d'une matrice extra cellulaire (MEC) contrôlée, les cellules de la BHE peuvent ainsi s'auto-organiser en un réseau de microvaisseaux [10]. L'essor de la

microfluidique a entraîné le développement de micropuces dans lesquelles les cellules ou les tissus 3D reconstitués peuvent être perfusés pour mimer le flux sanguin ou le flux interstitiel lymphatique. Ces microsystèmes physiologiques de type « organe-sur-puce » se développent comme alternatives pour les études précliniques de la BHE [11 - 14]. Après validation, l'objectif est de passer à des études sur le GBM sous la forme de tumeur-sur-puce vascularisée. Les techniques d'imagerie et d'histologie sont à la base de la validation de ces modèles d'ingénierie *in vitro*. Dans cet article, nous reviendrons sur les avantages de ces techniques et les défis induits par les spécificités de l'ingénierie tissulaire et des systèmes microfluidiques. Nous nous appuierons sur un exemple de développement d'un modèle 3D *in vitro* humain de la BHE, et d'un « GBM-sur-micropuce ». Nous expliquerons le rôle des analyses biochimiques externalisées pour la mise en place de ces nouvelles approches.

## MATERIELS ET METHODES

### 1. Culture cellulaire

Les lignées cellulaires de la barrière hémato-encéphalique ont été gracieusement fournies par la Tokyo University of Pharmacy and Life Science: cellules endothéliales humaines microvasculaires cérébrales (HBMEC/ci18), péricytes humains cérébraux (HBPC/ci37), astrocytes humains (HASTR/ci35) (validées préalablement [15 - 17]). Des cellules de glioblastome multiforme commerciales seront également utilisées (U87-MG, ATCC HTB-14). Le maintien de la culture nécessite des supports fonctionnalisés au collagène et une légère hypothermie pour les cellules de la BHE (incubation à 33 °C contre 37 °C pour les cellules de glioblastome), et des milieux spécifiques (VEGF-mv kit, LifeLine + 5% SVF pour cellules endothéliales ; PM, Sciencell pour péricytes ; DMEM + 10% SVF + 1% supplément N2x100, Gibco pour astrocytes ; MEM + 10% SVF pour cellules de glioblastome) supplémentés en blasticidine (4 µg/mL) pour le maintien de la pression sélective des cellules de la BHE en addition au conventionnel 1% (v/v) de pénicilline-streptomycine (10 000 U/mL, 10 g/mL).

Trois jours avant ensemencement en hydrogel, les cellules de la BHE étaient prédifférenciées à 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>.

## 2. Hydrogel

L'hydrogel est formé d'un mélange de collagène microfibrillaire de type I (CMF pour *collagen microfibers*, préparé à l'Université d'Osaka [18,19] ou au sein de l'entreprise TOPPAN INC., Japon) et de fibrine : 16 mg/mL de CMF + 6,6 mg/mL de fibrinogène + 10 µL/L de thrombine [10, 14, 19]. 10x10<sup>6</sup> cellules/mL étaient ensemencées dans des volumes d'hydrogel de 5, 30 ou 70 µL en maintenant un ratio de 1:2:0,5 (cellules endothéliales : astrocytes : péricytes). L'hydrogel était incubé pendant 7 jours à 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> dans un milieu mixte composé à 1:1:1 de chacun des milieux de culture spécifiques sans ajout de blasticidine.

## 3. Immunofluorescence et histologie

Pour les expériences d'immunofluorescence [10,14,19], les échantillons ont été fixés au paraformaldéhyde (4%, 4 °C) pendant au moins 6 h. Après 3 rinçages au tampon phosphate NaCl 9 % (PBS), ils ont ensuite été perméabilisés au Triton X-100 pendant 15 min, rincés puis bloqués avec une solution à 1% (v/v) de sérum albumine bovine (SAB dans PBS). Les échantillons ont ensuite été incubés pendant 40 h à 4 °C avec l'anticorps primaire dilué à 1% (v/v) dans la solution de SAB (anticorps murin anti-CD31 humain, NCL-CD31-1A10, > 57 mg/mL, Leica). Après rinçage, les échantillons ont été exposés pendant 2 h à température ambiante au Hoechst pour la coloration des noyaux (1/1000) et à l'anticorps secondaire dilué à 1% (v/v) dans la solution de SAB (chèvre anti-murin, AlexaFluor 647 A21235, 2 mg/mL, ThermoFisher Scientific). Après un dernier cycle de rinçage, les échantillons ont été observés avec un microscope confocal : un Confocal Quantitative Image Cytometer CQ1, Yokogawa, pour les grossissements x4 à x20 directement dans la plaque de culture et un Confocal Laser Scanning Microscope Fluoview FV3000, Olympus, pour les grossissements x10 à x60 avec des échantillons placés sur une lame de verre, recouverts d'une goutte de PBS. Les projections en z-stacks ont été réalisées

avec des pas de 15  $\mu\text{m}$  pour le x4 ; 10  $\mu\text{m}$  pour le x10 ; 5  $\mu\text{m}$  pour le x20 ; et pour les valeurs inférieures à 2  $\mu\text{m}$  à x60).

Pour l'histologie, les tissus présentés ici proviennent de coupes (5-10  $\mu\text{m}$ , au cryotome Leica CM1510S) réalisées après insertion de l'échantillon dans un bloc cryogénisé (Tissue-Tek O.C.T. Compound, passage rapide à  $-80^\circ\text{C}$  puis conservation à  $-20^\circ\text{C}$ ). La méthodologie d'immunomarquage et d'observation était identique aux échantillons entiers.

Les analyses d'image ont été réalisées sur le logiciel Fiji [20] : comparaison du diamètre et du nombre de lumières (3 images par échantillon histologique), comparaison d'intensité fluorescente, des aires de surfaces fluorescentes (3 images par échantillon d'immunofluorescence, au grossissement x60), et avec le module BoneJ [21] comparaison du diamètre, du nombre de croisements et de la longueur des capillaires (3 images par échantillon d'immunofluorescence, au grossissement x20).

## 4. Micropuce

Un logiciel de conception 3D (Solidworks) a été utilisé pour modéliser le moule des micropuces ou les supports pour l'insertion de l'aiguille. Le fichier de géométrie 3D (.stl) créé a été transféré sur un logiciel de paramétrage de l'impression 3D (Ultimaker Cura) qui génère le fichier (.gcode) pour commander l'impression 3D par extrusion de fil à base d'acide polylactique (PLA) (imprimante 3D Ultimaker 2+).

Sous hotte, le polydiméthylsiloxane (PDMS, Sylgard 184 Silicone Elastomer kit, Dow) a été mélangé à 1:10 avec un agent de réticulation. Le mélange est resté 30 min dans un dessiccateur avec pompe à vide afin d'éliminer les bulles d'air introduites lors du mélange. Il a été coulé dans le moule en PLA avant d'être polymérisé à l'étuve à  $50^\circ\text{C}$  pendant 5 h. Suite au démoulage, les micropuces ont été nettoyées à l'éthanol 70% et stérilisées sous UV pendant 30 min.

Un support réalisé par impression 3D a été utilisé pour maintenir la micropuce et insérer en son cœur une aiguille d'acupuncture (TEWA 0,25x40, Dolphitonic). 20  $\mu\text{L}$  d'hydrogel ont été coulé autour de cette aiguille. Après 1 h de gélation à  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ , 20  $\mu\text{L}$  de milieu de culture ont été ajouté pour 2 h d'incubation

supplémentaire. L'aiguille a été ensuite retirée d'un coup sec. La micropuce a ensuite été placée sur une lame de verre. Les tubulures reliées à un pousse-seringue ont alors pu être ajustées sur les côtés de la puce. Le système a été placé sous microscope (Microscope optique inversé Motic AE2000) pour l'étude de l'impact du flux sur l'hydrogel. Les vitesses suivantes ont été choisies: 100, 50 et 25  $\mu\text{L}/\text{min}$ .

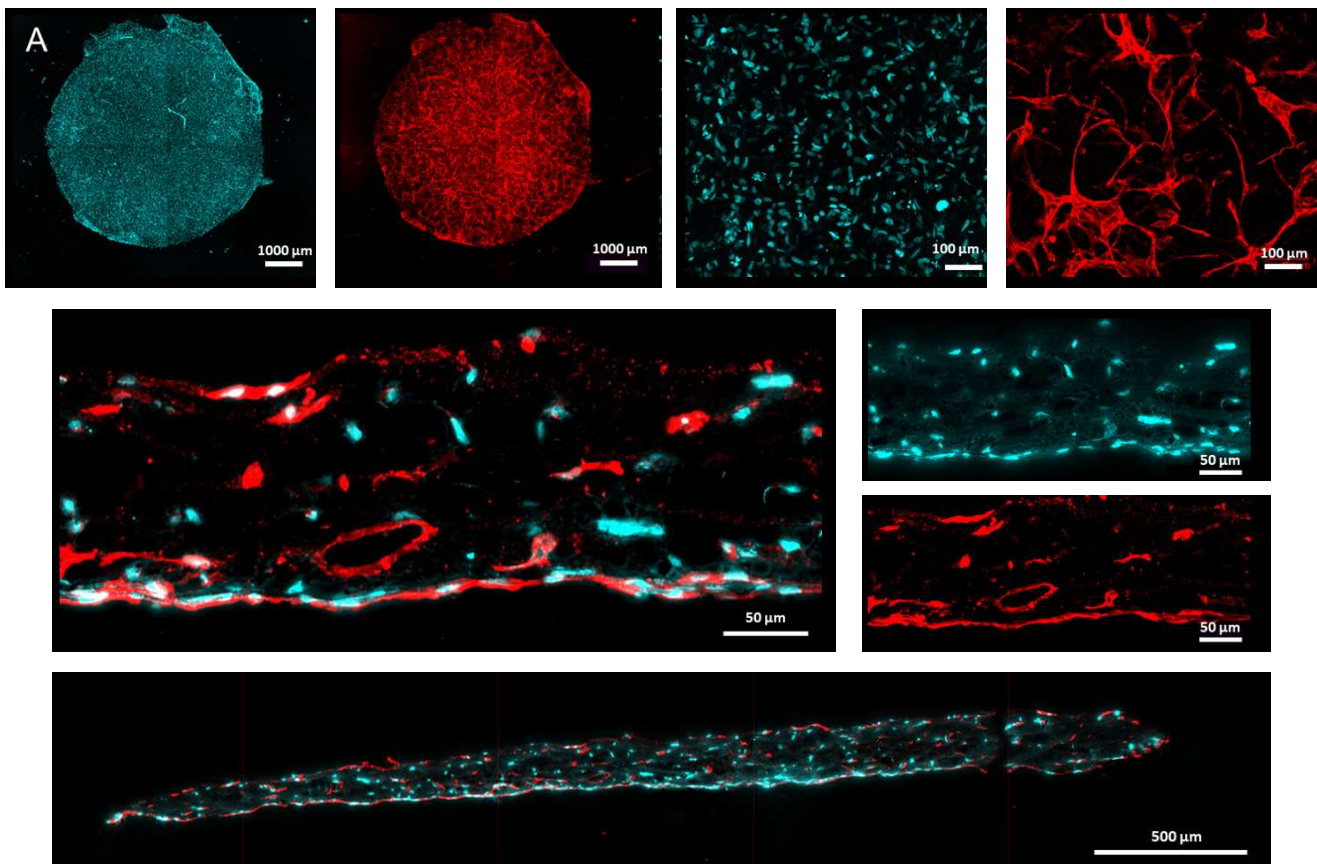
## RESULTATS ET DISCUSSION

### 1. Observations microscopiques de microvaisseaux reconstitués au sein d'hydrogels

Ce projet a commencé avec l'optimisation de la composition d'un hydrogel de fibrine et de collagène de type I (ratios, concentrations, propriétés du collagène microfibrillaire). Comme cela a déjà été publié, ce type d'hydrogel est biocompatible et facilite l'auto-organisation de cellules de mammifères en 3D [18,22]. En 5 à 7 jours, une co-culture des 3 types cellulaires principaux de la BHE peut ainsi s'organiser en un réseau de capillaires [10]. La microarchitecture de ces microvaisseaux cérébraux a été étudiée par microscopie confocale et immunofluorescence (**Figure 1A**).

Les cellules endothéliales de microvaisseaux cérébraux sont marquées par la CD31, une protéine de jonctions adhérentes surexprimée dans la BHE. Les péricytes et astrocytes humains ne sont ici pas marqués spécifiquement. Le Hoechst marque néanmoins tous les noyaux et donne un aperçu de la répartition homogène des cellules dans le gel. Une élongation des cellules endothéliales et la formation d'un réseau de tubes endothéliaux est visible sur ces images. Comme pour des tissus ex-vivo la complexité réside ici dans l'épaisseur et l'hétérogénéité des échantillons. Pour faciliter la gestion des manipulations, des essais de variation de temps de fixation avec le paraformaldéhyde ont été conduits au-delà de 15 min : il ne semble pas y avoir d'avantages notoires, ni de dégradation (jusqu'à 1 semaine à 4 °C). L'étape cruciale pour obtenir un marquage homogène est l'incubation avec l'anticorps





**Figure 1 :** Modèle issu de l'ingénierie tissulaire de la microvasculature cérébrale : auto-organisation d'une co-culture cellulaire dans un hydrogel de collagène-fibrine. A : Imagerie confocale après immunofluorescence de l'hydrogel entier (HBEC + HA + HP), noyaux colorés au Hoechst (cyan) et jonctions serrées des cellules endothéliales marquées par anticorps anti-CD31 (rouge). B : Imagerie confocale après la même immunofluorescence sur micro-coupes transversales de l'hydrogel.

primaire. Le but est d'obtenir un signal fluorescent suffisamment intense pour pouvoir le visualiser à travers l'hydrogel et sur des épaisseurs de tissus de plusieurs dizaines voire centaines de micromètres. Les volumes nécessaires afin de recouvrir l'ensemble du gel sont forcément plus élevés qu'en 2D. Le temps d'incubation doit également être rallongé afin que l'anticorps puisse pénétrer au cœur du gel. De meilleurs résultats ont été obtenus après une incubation pendant 40 h à 4 °C plutôt qu'une incubation conventionnelle de 2 à 4 h à température ambiante. Différentes concentrations d'anticorps ont été testées et la concentration optimale était de 570 µg/mL (1% v/v de la solution commerciale). Une augmentation de cette concentration est peu efficace en plus du désavantage d'augmenter significativement les coûts. Afin de

s'affranchir de l'atténuation de la fluorescence liée à l'hydrogel, il est possible de procéder à une transparençisation des échantillons à l'aide de solutions à haut indice de réfraction (ex : Rapiclear®). Cette technique fonctionne assez bien pour une matrice de composition majoritaire en collagène. Toutefois, les observations restent contraintes sur quelques 50-100 µm d'épaisseur en fonction du microscope à fluorescence utilisé, de l'expression protéique, du marquage immunologique et de la densité de l'hydrogel. L'utilisation d'autres types de microscopes avec un taux de pénétration plus important (à 2 photons, ou à feuille de lumière) ou de techniques associées à la tomographie pourraient permettre d'améliorer encore l'étude des tissus 3D dans leurs limites respectives.

Les coupes histologiques en transversal permettent de voir la totalité de l'épaisseur du tissu, et de mieux identifier les lumières des tubes endothéliaux (**Figure 1B**). Les lumières ont un diamètre moyen de 8-10 µm ce qui correspond aux capillaires sanguins de la BHE. Le choix de l'inclusion des échantillons dans un bloc cryogénisé ou en paraffine dépend de la nature du tissu. Pour les modèles de vascularisation de la BHE, les deux techniques semblaient convenir (à l'inverse de tissus contenant des adipocytes par exemple qui supportent mieux la paraffine [23,24]). Bien que ce ne soit pas lié à l'ingénierie tissulaire, il est à souligner que le choix du marquage immunofluorescent ou immunochimique impacte le choix du microscope : confocal ou champ large. Si le microscope choisi ne dispose pas d'un système de tuilage, un microscope peut être nécessaire pour observer l'entièreté du tissu.

Une analyse numérique des images de microscopie permet une approche comparative de la longueur des microvaisseaux, de leur nombre de croisements, leur épaisseur (échantillons d'immunofluorescence) et également du diamètre des lumières (coupes histologiques). Comme publié précédemment, des analyses par Western blot, RT-q-PCR, et transcriptomique ont permis de compléter ces analyses microscopiques et de mettre en évidence une augmentation significative de l'expression des protéines et gènes clefs de la BHE (jonctions serrées, transporteurs et canaux membranaires [10]) comparée à une culture conventionnelle en 2D.

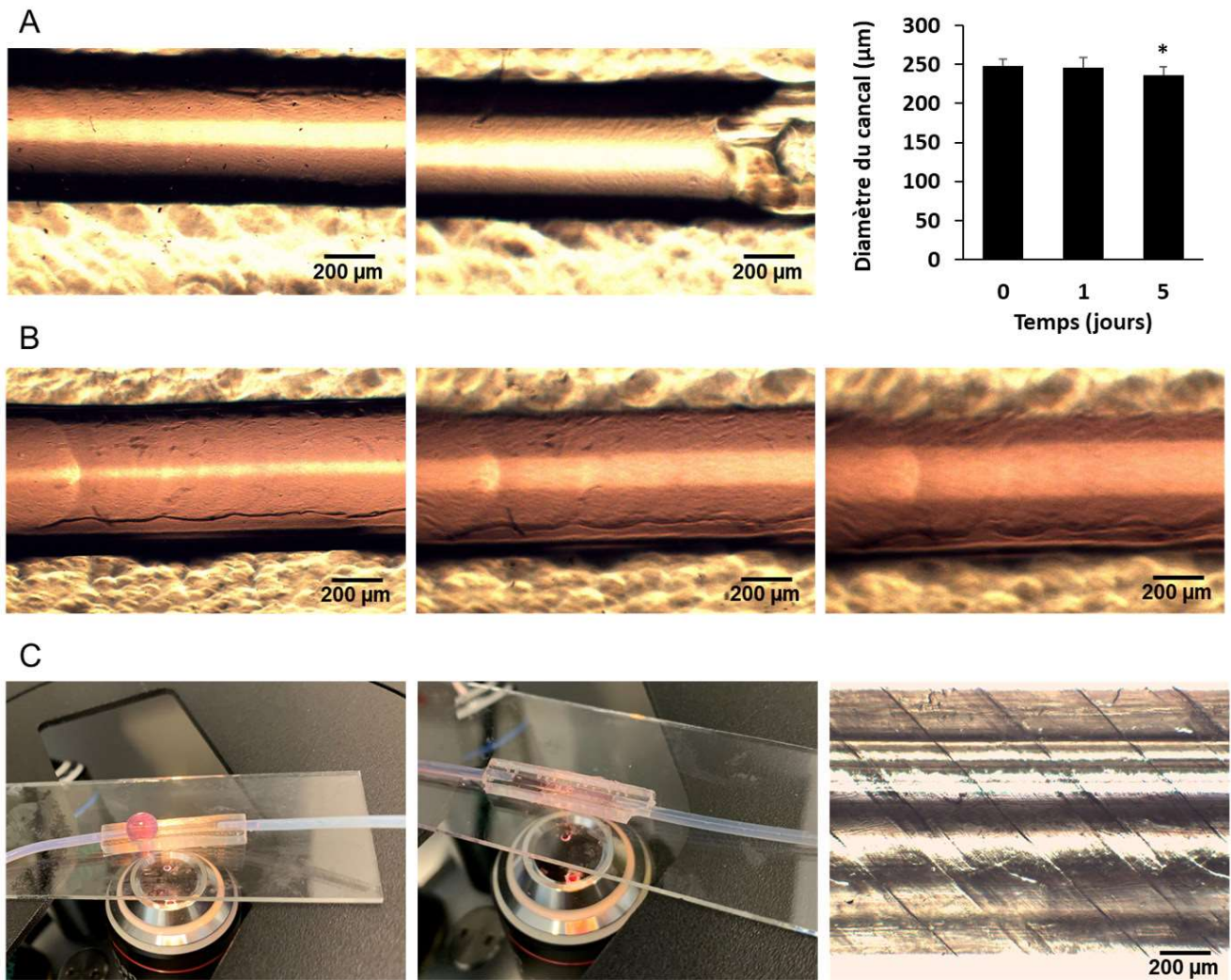
## 2. Etapes pour la validation de tumeurs-sur-puces perfusées

Le deuxième objectif de ce projet, s'appuyant sur la microfluidique, avait pour but de mimer le flux sanguin et faciliter l'apport en milieu nutritif au sein du tissu. Un premier essai développé en 2020 [14] au sein d'un système macroscopique a abouti à une organisation des capillaires de manière orthogonale au sens de perfusion. Ce flux interstitiel a entraîné une amélioration de la résolution du réseau de capillaires et une augmentation de l'expression de certaines des protéines typiques de la BHE. Notre objectif est à présent de perfuser l'intérieur des microvaisseaux et d'insérer des cellules tumorales dans le modèle pour mimer la BHE dans un contexte pathologique. Pour cela, des micropuces sont développées à façon (**Figure 2**) via une approche de conception assistée par ordinateur (CAO). L'impression 3D de moule en polymère (acide polylactique, connu pour sa biocompatibilité), dans lequel est coulée la micropuce en polydiméthylsiloxane (PDMS) permet de tester une versatilité d'architecture pour des coûts raisonnablement faibles.

Dans ces micropuces, l'hydrogel est gélifié autour d'une aiguille d'acupuncture. Une fois l'aiguille retirée, le canal sculpté dans l'hydrogel peut être perfusé, il devient un modèle de veinule. La veinule ainsi créée peut être observée au microscope plein champ et sans coloration (**Figure 2A et B**).

Nous nous sommes intéressés à la validation de la stabilité de ce canal central au cours du temps. Une difficulté de mise au point complique néanmoins la mesure du diamètre du canal par analyse d'image. Chacun des matériaux composant les échantillons a un indice de réfraction différent. La puce présentée ici comporte une épaisseur de 0,95 mm de PDMS, 1,4 mm d'hydrogel (environ 20  $\mu$ L dans toute la puce) autour du canal qui a une hauteur d'environ 0,25 mm (diamètre de l'aiguille) et est rempli de milieu de culture. La géométrie et l'état de surface sont également cruciaux pour la détection du canal. Pour éviter l'apparition de stries sur le fond de la puce, le fichier de commande d'impression 3D du moule a ainsi dû être modifié (impression en diagonal par rapport au sens de la veinule). La transparence optique du PDMS est liée à la qualité du coulage. Le temps de dégazage a

été rallongé de 15 à 30 min pour limiter la formation de bulles d'air venant se coincer dans la micropuce et empêchant l'observation microscopique. Pour améliorer l'adhésion de l'hydrogel à la surface du PDMS, donc limiter les bulles d'air dans l'hydrogel, des inégalités d'épaisseur et une inhomogénéité lors de la gélification, une fonctionnalisation chimique de la puce est également envisagée (revêtement primaire au collagène par exemple [13]).



**Figure 2 :** Visualisation de l'hydrogel au sein de la micropuce en PDMS. A : Canal central formé dans l'hydrogel après retrait d'une aiguille, avec à gauche : canal au centre de la puce, milieu : ouverture du canal en bord de micropuce, droite : très légère diminution du diamètre du canal au bout de 5 jours de culture. B : Illustration de la difficulté de statuer sur un champ focal avec un microscope champ large. C : Premiers essais de perfusion de la micropuce, avec à gauche : micropuce ouverte et fuite du fluide, au milieu : micropuce fermée sans fuite, à droite : difficulté de la visualisation de l'hydrogel avec aiguille au sein de la micropuce fermée.

La seconde étape de ce travail a été centrée autour des essais de perfusion au sein des micropuces *via* ce canal central connecté à un système de tubulures. Celles-ci, ainsi que l'ensemble pompe et réservoirs peuvent être encombrant lorsqu'il s'agit de placer le dispositif sous microscope pour observer le flux de milieu. Le design du « micro-dispositif » doit donc prendre en compte la configuration des microscopes utilisés par la suite. La Figure 2C illustre les fuites lors de la perfusion de notre premier prototype de puce, ouverte sur le dessus. Un prototype de puce fermée a été réalisé, qui permet une perfusion satisfaisante, mais l'épaisseur de PDMS nécessaire empêche une observation fine de l'hydrogel, du canal et des cellules au sein de celui-ci. Un quatrième prototype est en cours de réalisation avec un assemblage par plasma O<sub>2</sub> d'une lamelle de verre pour fermer la puce en PDMS et ainsi améliorer la qualité de l'imagerie cellulaire dans ce micro-dispositif.

Les techniques d'histologie nécessitent la récupération de l'échantillon biologique hors de la micropuce après la fin de la culture, une étape qui doit être facilitée. Le développement de la micropuce doit prendre cet aspect en compte et favoriser une extraction de l'échantillon biologique en endommageant le moins possible la morphologie du tissu. Nous avons parlé ici de la fonctionnalisation chimique de la micropuce en PDMS pour favoriser l'adhésion de l'hydrogel. Une telle adhésion pourra néanmoins favoriser des déchirures lors de l'extraction du tissu. L'utilisation d'une solution de SAB pourrait faciliter le décollage comme cela a été montré pour l'extraction de l'aiguille après gélification de l'hydrogel [25]. La jonction PDMS-lame de verre doit être suffisamment forte pour tenir malgré les possible forces de cisaillement de la perfusion, mais peut également être considérée comme un point d'ouverture facilitée de la micropuce. Il est également possible de découper le PDMS, néanmoins la précision et la reproductibilité de découpe sur ce type de matériaux représentent des défis techniques.

Pour les analyses biochimiques sur acides nucléiques ou protéines, il n'est pas nécessaire d'extraire le tissu en intégrité. Une première possibilité est la lyse chimique du tissu *in situ*. Une seconde possibilité est la récupération du milieu après perfusion. L'examen des molécules secrétées par les cellules, notamment *via* l'étude des vésicules extracellulaires, permet de mieux caractériser le

modèle. Ces signaux sont néanmoins généralement faibles et transitoires ce qui demandera de développer des techniques de pré-concentration, ou des biocapteurs à façon [26- 28]. De plus, le PDMS est connu pour adsorber certains types de molécules, un contrôle des biais devra être utilisé [29, 30]. Ce type de projet multidisciplinaire repose sur des collaborations entre chercheuses et chercheurs mais également entre plateformes et instituts de recherche. L'accès aux appareils de caractérisation/tests peut se faire dans des lieux géographiques différents ce qui nécessite de concevoir un système robuste pouvant être transporté ou reproduit d'un laboratoire à l'autre sans modifications notables de l'environnement et des performances du système microphysiologique.

## CONCLUSION

Les techniques d'ingénierie tissulaire ont permis de développer un modèle de microvaisseaux de la BHE au sein d'un hydrogel collagène – fibrine. Des prototypes de micropuces ont été développés afin d'accueillir cet hydrogel et de le perfuser à travers une veinule centrale. Cet article souligne l'importance des techniques d'imagerie cellulaire pour ce type de modèles *in vitro* et met en avant les défis émergents en termes de distance focale, matériaux et design des systèmes microfluidiques. Les techniques d'analyses biochimiques complètent la validation par microscopie, mais font également face à des limites : récupération des échantillons et concentrations suffisantes des protéines et molécules à détecter. L'intégration de biocapteurs *in situ* serait une piste prometteuse pour améliorer le suivi du microenvironnement tumoral.

## REMERCIEMENTS

Nous remercions nos sources de financement pour ce projet : the Japan Agency for Medical Research and Development (AMED-MPS 19be0304207h003), la bourse KAKENHI (No. 17K08330), la Région Bourgogne Franche-Comté (ANER 3D Glimpse, 2022/13830 et 2022/13831) et le prix innovation 2023 Descroix-Vernier

EthicScience. Ce projet 3D Glimpse a été en partie soutenu par le réseau RENATECH des plateformes de technologie du CNRS au sein de FEMTO-ST.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. PARDRIDGE, W.M. Blood-brain barrier delivery. *Drug Discovery Today*, 2007, **112** (1) 54–61.
2. PARDRIDGE, W.M. The blood-brain barrier: Bottleneck in brain drug development. *NeuroRX*, 2005, **12** (1) 3–14.
3. CHOWDHURY, E.A., NOORANI, B., ALQAHTANI, F., BHALERAO, A., RAUT, S., SIVANDZADE, F. & CUCULLO, L. Understanding the brain uptake and permeability of small molecules through the BBB: A technical overview. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 2021, **141** (8) 1797–820.
4. FAN, Y., ZHANG, X., GAO, C., JIANG, S., WU, H., LIU, Z. & DOU, T. Burden and trends of brain and central nervous system cancer from 1990 to 2019 at the global, regional, and country levels. *Archives of Public Health*, 2022, **1780** (1) 209.
5. KREX, D., KLINK, B., HARTMANN, C., VON DEIMLING, A., PIETSCH, T., SIMON, M., SABEL, M., STEINBACH, J.P., HEESE, O., REIFENBERGER, G., WELLER, M., SCHACKERT, G., & GERMAN GLIOMA NETWORK. Long-term survival with glioblastoma multiforme. *Brain: A Journal of Neurology*, 2007, **130** (Pt 10) 2596–606.
6. MCMAHON D.J., GLEESON J.P., O'REILLY S., BAMBURY R.M. Management of newly diagnosed glioblastoma multiforme: current state of the art and emerging therapeutic approaches. *Med Oncol*. 2022, **39**(9):129.
7. ŽAVBI, J. & BREZNIK, B. Modelling the microenvironment of the most aggressive brain tumours for preclinical studies. *Advances in Cancer Biology - Metastasis*, 2021, **13** 100017.
8. GHILU, S., KURMASHEVA, R.T. & HOUGHTON, P.J. Developing New Agents for Treatment of Childhood Cancer: Challenges and Opportunities for Preclinical Testing. *Journal of Clinical Medicine*, 2021, **10** (7) 1504.
9. SONG, H.W., FOREMAN, K.L., GASTFRIEND, B.D., KUO, J.S., PALECEK, S.P. & SHUSTA, E.V. Transcriptomic comparison of human and mouse brain microvessels. *Scientific Reports*, 2020, **2310** (1) 12358.

10. FIGAROL, A., NAKA, Y., SHIGEMOTO-MOGAMI, Y., FURIHATA, T., SATO, K. & MATSUSAKI, M. An in vitro self-organized three-dimensional model of the blood-brain barrier microvasculature. *Biomedical Materials*, 2020, **16** (1). 015006.
11. CAMPISI, M., SHIN, Y., OSAKI, T., HAJAL, C., CHIONO, V. & KAMM, R.D. 3D self-organized microvascular model of the human blood-brain barrier with endothelial cells, pericytes and astrocytes. *Biomaterials*, 2018, **180** 117–29.
12. LEE, S., CHUNG, M., LEE, S.-R. & JEON, N.L. 3D brain angiogenesis model to reconstitute functional human blood-brain barrier in vitro. *Biotechnology and Bioengineering*, 2019, **117**(3):748–762.
13. BOUHRIRA, N., DEORE, B.J., SAZER, D.W., CHIARADIA, Z., MILLER, J.S. & GALIE, P.A. Disturbed flow disrupts the blood-brain barrier in a 3D bifurcation model. *Biofabrication*, 2020, **12** (2) 025020.
14. FIGAROL, A., PIANTINO, M., FURIHATA, T., SATOH, T., SUGIURA, S., KANAMORI, T. & MATSUSAKI, M. Interstitial flow regulates in vitro three-dimensional self-organized brain micro-vessels. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2020, **10533** (3) 600–6.
15. ITO, R., UMEHARA, K., SUZUKI, S., KITAMURA, K., NUNOYA, K., YAMAURA, Y., IMAWAKA, H., IZUMI, S., WAKAYAMA, N., KOMORI, T., ANZAI, N., AKITA, H. & FURIHATA, T. A human immortalized cell-based blood-brain barrier tri-culture model: development and characterization as a promising tool for drug brain permeability studies. *Molecular Pharmaceutics*, 2019, **16** (11):4461–4471.
16. UMEHARA, K., SUN, Y. & HIURA, S. A New Conditionally Immortalized Human Fetal Brain Pericyte Cell Line Establishment and Functional Characterization as a Promising Tool for Human Brain Pericyte Studies. *Molecular neurobiology*, 2018, **55** (7) 5993–6006.
17. FURIHATA, T., ITO, R., KAMIICHI, A., SAITO, K. & CHIBA, K. Establishment and characterization of a new conditionally immortalized human astrocyte cell line. *Journal of Neurochemistry*, 2016, **136** (1) 92–105.
18. LIU, H., KITANO, S., IRIE, S., LEVATO, R. & MATSUSAKI, M. Collagen Microfibers Induce Blood Capillary Orientation and Open Vascular Lumen. *Advanced Biosystems*, 2020, **4** (5) 2000038.



19. MATSUSAKI, M. & FIGAROL, A. Cerebrovascular model and device. 2020.. WO2020196678A1, <https://patents.google.com/patent/WO2020196678A1/en>
20. SCHINDELIN, J., ARGANDA-CARRERAS, I., FRISE, E., KAYNIG, V., LONGAIR, M., PIETZSCH, T., PREIBISCH, S., RUEDEN, C., SAALFELD, S., SCHMID, B., TINEVEZ, J.-Y., WHITE, D.J., HARTENSTEIN, V., ELICEIRI, K., TOMANCAK, P. & CARDONA, A. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, 2012, **9** (7) 676–82.
21. DOUBE, M., KŁOSOWSKI, M.M., ARGANDA-CARRERAS, I., CORDELIÈRES, F.P., DOUGHERTY, R.P., JACKSON, J.S., SCHMID, B., HUTCHINSON, J.R. & SHEFELBINE, S.J. BoneJ: Free and extensible bone image analysis in ImageJ. *Bone*, 2010, **147** (6) 1076–9.
22. SHANG, Y., ZENG, J., XIE, Z., SASAKI, N. & MATSUSAKI, M. Effect of Extracellular Matrix Density and Cell Number on Blood Capillary Formation in Three-Dimensional Tissue. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 2022, **595** (8) 1163–8.
23. KARANFIL, A.S., LOUIS, F. & MATSUSAKI, M. Biofabrication of vascularized adipose tissues and their biomedical applications. *Materials Horizons*, 2023, **10**(5):1539–1558.
24. LOUIS, F., SOWA, Y., IRIE, S., KITANO, S., MAZDA, O. & MATSUSAKI, M. Injectable Prevascularized Mature Adipose Tissues (iPAT) to Achieve Long-Term Survival in Soft Tissues Regeneration., 2022, **11**(23):e2201440.
25. LEE, E., TAKAHASHI, H., PAUTY, J., KOBAYASHI, M., KATO, K., KABARA, M., KAWABE, J. & T. MATSUNAGA, Y. A 3D *in vitro* pericyte-supported microvessel model: visualisation and quantitative characterisation of multistep angiogenesis. *Journal of Materials Chemistry B*, 2018, **6** (7) 1085–94.
26. WONG, J.F., MOHAN, M.D., YOUNG, E.W.K. & SIMMONS, C.A. Integrated electrochemical measurement of endothelial permeability in a 3D hydrogel-based microfluidic vascular model. *Biosensors and Bioelectronics*, 2020, **147** 111757.
27. LIANG, Y. & YOON, J.-Y. *In situ* sensors for blood-brain barrier (BBB) on a chip. *Sensors and Actuators Reports*, 2021, **3** 100031.

28. CLARKE, G.A., HARTSE, B.X., NIARAKI ASLI, A.E., TAGHAVIMEHR, M., HASHEMI, N., ABBASI SHIRSAVAR, M., MONTAZAMI, R., ALIMORADI, N., NASIRIAN, V., OUEDRAOGO, L.J. & HASHEMI, N.N. Advancement of Sensor Integrated Organ-on-Chip Devices. *Sensors*, 2021, **21** (4) 1367.
29. SCHNEPPER, M.T., ROLES, J. & HICKMAN, J.J. Characterization of Drug–Polymer Adsorption Isotherms in Body-on-a-Chip Systems by Inverse Liquid–Solid Chromatography. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 2020, **6** (8) 4462–75.
30. GRANT, J., ÖZKAN, A., OH, C., MAHAJAN, G., PRANTIL-BAUN, R. & INGBER, D.E. Simulating drug concentrations in PDMS microfluidic organ chips. *Lab on a Chip*, 2021, **21** (18) 3509–19.