UNIVERSITÉ DE LORRAINE | BIBLIOTHÈQUES UNIVERSITAIRES

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact bibliothèque : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr
(Cette adresse ne permet pas de contacter les auteurs)

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

Ecole Doctorale : Chimie Mécanique Matériaux Physique (C2MP)

Laboratoire : Institut Jean Lamour

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE l'UNIVERSITE DE LORRAINE

Discipline : Sciences des matériaux

Par : Zakaria Baka

Elaboration de cancers sur puce pour des applications en thérapies anticancéreuses

Soutenue publiquement le : 8 septembre 2023

Composition du jury :

Halima Kerdjoudj	**Professeure, Université de Reims Champagne-Ardenne**	**Présidente du jury**
Halima Alem-Marchand	**Professeure, Université de Lorraine**	**Directrice de thèse**
Olivier Joubert	**Professeure, Université de Lorraine**	**Co-Directeur de thèse**
Christophe Marquette	**Directeur de Recherche CNRS**	**Rapporteur**
Thérèse Leblois	**Professeure, Université de Franche-Comté**	**Rapportrice**
Alain Jonas	**Professeur, Université catholique de Louvain**	**Examinateur**
Cécile Lemaitre	**Maitre de Conférences, Université de Lorraine**	**Membre invitée**
Agathe Figarol	**Maitre de Conférences, Université de Franche-Comté**	**Membre invitée**

Remerciements

La rédaction de ce manuscrit marque la fin de quatre années de thèse terriblement dures et éprouvantes. Quatre années durant lesquelles j'ai dû lutter chaque jour pour garder la tête hors de l'eau. Quatre années qui ont mis mon courage et ma détermination à rude épreuve. Quatre années où les difficultés, les aléas, les problèmes et les imprévus se sont enchainés à un rythme effréné ne me laissant aucun répit. Le parcours fut si rude, si difficile que le moindre petit succès était pour moi synonyme d'une immense victoire. A l'heure où je rédige ces quelques lignes, seul dans une salle alors qu'il est déjà 20h passée, je revois tout un tas de souvenirs ; tout un tas d'images et de moments. Je me sens envahi par une déferlante d'émotions qui me fait perdre le fil de mes idées et m'arrache quelques larmes au passage. Oui, je suis ému ! Je suis ému car je me revois en octobre 2019 dire au revoir à ma chère maman, ne sachant pas alors que je n'allais plus la revoir durant plus de 3 ans. Je suis ému car je me revois lors de mon premier jour à l'Institut Jean Lamour, un peu perdu, un peu épeuré. Je suis ému car je repense aux mois de confinement que j'ai passés seul dans mon logement étudiant. Je suis ému car je repense à toutes ces manips ratées, à toutes ces interrogations, à toute cette frustration qui a été ma plus fidèle compagne quatre année durant.

Ces quatre années furent rudes et difficiles mais j'ai réussi à m'en sortir. Certes avec des kilos en plus et des cheveux en moins mais j'ai quand même réussi à m'en sortir. J'ai réussi à apprendre, à m'améliorer, à progresser tant sur le plan personnel que sur le plan professionnel. Ces quatre années furent dures mais formatrices, sévères mais très instructives, cruelles mais très enrichissantes. Ce furent en tout cas les années les plus marquantes et les plus intenses de ma vie.

Si j'ai réussi à m'en sortir durant ces quatre années c'est d'abord parce que j'ai su trouver en moi la force de lutter, de me battre. Si j'ai réussi à m'en sortir c'est aussi parce que j'ai fait de très belles rencontres. J'ai eu la chance de pouvoir compter sur des personnes extraordinaires qui ont su me maintenir à flot, me rassurer quand tout semblait perdu. Aussi, je souhaite, à travers ces quelques mots, rendre hommage à toutes ces personnes.

Mais avant toute chose, je tiens à remercier les membres du jury d'avoir accepté d'évaluer ce modeste travail.

Je remercie aussi ma directrice de thèse, Madame Halima Alem-Marchand, pour m'avoir confié ce projet. Chère Halima, si je t'adresse mes remerciements, c'est bien sûr par reconnaissance à ton soutien tout au long de la conduite de cette thèse. Mais si je te remercie, c'est d'abord et avant tout parce que tu as su croire en moi. Tu as su dépasser les craintes et les réticences associées à ma situation de handicap. Tu as su t'adapter à ma particularité. Tu as accepté de me donner ma chance. Pour tout cela, je te suis très reconnaissant.

Je remercie aussi mon co-directeur de thèse, Monsieur Olivier Joubert, notamment pour sa contribution à la correction de ce manuscrit.

Je remercie tous nos collaborateurs pour leur contribution essentielle dans le cadre de cette thèse :

- ✓ A l'institut de Cancérologie de Lorraine : Madame Lina Bolotine et Madame Laureline Lamy : Un mot en particulier pour toi, chère Laureline, tu as été une collaboratrice absolument formidable. Un très grand merci pour l'implication dont tu as fait preuve dans le cadre de ce projet ;
- ✓ Au Laboratoire Réactions et Génie des Procédés (LRGP) : Madame Cécile Lemaitre. Merci à vous pour votre aide si précieuse dans le cadre de la partie microfluidique de cette thèse ;
- ✓ Au Centre de recherche en biomédecine de Strasbourg (CRBS) : Madame Varvara Gribova : Un grand merci pour votre aide dans le cadre de l'imagerie par microscopie confocale. Ce fut une véritable chance de pouvoir bénéficier de votre expertise.

Et du plus profond de mon cœur, je tiens à remercier infiniment :

Mes parents, et en particulier ma chère maman que j'aime tant. Que pourrais-je te dire ? tous les mots de toutes les langues du monde ne suffiraient pas à exprimer mon amour, ma gratitude, ma reconnaissance envers toi. Tu t'es sacrifiée pour moi, tu t'es acharnée pour que je puisse aller à l'école, recevoir une éducation, m'épanouir. Elever un enfant malvoyant n'est pas une mince affaire mais tu as su être largement à la hauteur. Tu as fait de moi l'homme que je suis. Et encore aujourd'hui et même si la distance nous sépare, tu continues à être à

mes côtés, à me soutenir. A chaque fois, tu sais trouver les mots justes pour me pousser à aller de l'avant. Pour tout cela, je te remercie du plus profond de mon être même si ces quelques lignes ne sont qu'une pâle expression de tout ce que je ressens pout toi.

Ma collègue et amie Dounia Louaguef : Chère Dounia, tu es une personne si belle, si généreuse que les mots me manquent pour te décrire. Par ta bonne humeur, ta positivité et ta détermination sans limites, tu as su égayer ce parcours de thèse si long, si ténébreux. Durant ces quatre années, tu as su être le soleil de mes journées et la lune de mes nuits. Des journées si cruelles que tu as su adoucir, que tu as su embellir. Je me rappelle de nos pauses-déj à la cafétéria de l'IJL, de nos courses à Auchan, de nos soirées au Pizza-Buffet comme d'autant de bons souvenirs. Tu as répondu présente à chaque fois que j'avais eu besoin de toi. Encore aujourd'hui, tu continues à me soutenir, à m'aider, à m'encourager. Aussi, je te remercie infiniment. Je te souhaite une vie riche et épanouissante à la hauteur de ton ambition.

Ma collègue et amie Claire Godier : Ma chère Claire, je t'écris ces quelques mots de remerciement en sachant pertinemment qu'ils ne valent pas grand-chose par rapport à tout ce que tu as fait pour moi. Tu es une personne absolument fabuleuse, si gentille, si généreuse. Je ne peux que me sentir chanceux et privilégié d'avoir croisé ton chemin. D'ailleurs, ta rencontre fut ni plus ni moins que le véritable point de départ de mon parcours de thèse. Par ta bonté, tu as accepté de réaliser toutes mes manipulations. Tu n'as pas hésité à rester au labo jusqu'à 20h passée ou à venir travailler un dimanche pour rattraper une manip suite à un « imprévu ». Tu as toujours été d'accord pour faire, refaire, tester, retester jusqu'à ce que ça marche. Pour moi, tu n'as pas hésité à voyager, à te déplacer de labo en labo, de ville en ville. Mais au-delà de tout ça tu as aussi été présente humainement à chaque fois que j'avais eu besoin de toi. Tu as toujours été là pour me consoler quand ça ne marchait pas, pour m'encourager quand je commençais à faiblir, pour me véhiculer quand Handistan me laissait sans transport. Honnêtement, je ne m'imagine pas refaire ce parcours sans toi à mes côtés. Tu m'as aidé à porter le terrible poids de cette thèse jusqu'à son aboutissement. Et quand je me suis lancé dans l'enseignement, tu as aussi été à mes côtés. Les TPs passés avec toi sont, pour moi, autant de bons souvenirs (même quand ça ne marchait pas comme il fallait). Pour tout ce que tu es et tout ce que tu as fait pour moi, je te remercie de tout mon cœur. Je te souhaite un parcours personnel et professionnel à la hauteur de ta bonté.

Mon ami Abhik Mallick : Cher Abhik, je te remercie d'abord parce que, grâce à ton expérience et à tes conseils, tu as largement contribué à mettre ce projet sur les rails. Je te remercie aussi d'être un si bon ami. Ta rencontre est l'une des plus belles choses qui me soit arrivée durant ces quatre années de thèse. Je sais que tu ne liras pas ces lignes car tu es resté totalement hermétique à la langue de Molière. Mais ne t'inquiète pas, je te ferai une traduction (comme d'habitude !).

Mon collègue Baptiste Labydoire : Cher Baptiste, même si je ne te connais que depuis quelques mois, tu as su marquer la fin de ma thèse. D'abord parce que tu as contribué à mes expérimentations de microfluidique et je t'en remercie. Mais honnêtement, ce n'est pas ça qui m'a motivé à te dédier ces quelques lignes. Je t'écris surtout pour te remercier d'être qui tu es : une belle personne. Par ton attitude profondément humaine (et aussi par ton vocabulaire si particulier !), tu as su créer en moi un très beau souvenir. Je te suis reconnaissant pour les beaux moments passés ensemble, à rédiger le dossier I-PhD ou à procrastiner dans l'espace vert à côté de l'IJL.

Mes stagiaires Farès Thagane ; Yunus Kilicer ; Zoé Magne ; Agathe Jusselin et Maire Stiefel. Ce fut un véritable plaisir de travailler avec vous. Vos qualités humaines et professionnelles m'ont profondément marqué.

Enfin je remercie toutes les personnes que je n'ai pas citées et qui ont contribué au bon déroulement de ce projet. A vous tous, un très grand MERCI !

Table des matières

TABLE DES MATIERES I

LISTE DES FIGURES V

LISTE DES TABLEAUX VII

LISTE DES ABREVIATIONS VIII

INTRODUCTION GENERALE 1

CHAPITRE 1 : ETAT DE L'ART 6

INTRODUCTION : ORGANISATION DE CE CHAPITRE 6

I. LES CANCERS OVARIENS 7

I.1. Données épidémiologiques *7*

I.1.1. Au niveau international 7

I.1.2. En France 7

I.2. Définition et diversité des cancers ovariens *8*

I.3. Le carcinome séreux de haut grade (HGSC) *9*

I.3.1. Données cliniques 9

I.3.2. Caractéristiques anatomo-histologiques 9

I.3.3. Marqueurs immunologiques 11

I.3.4. Caractéristiques moléculaires 13

I.3.5. Prise en charge et traitements 13

II. LES TECHNIQUES DE CULTURE CELLULAIRE EN 3D ET LEURS APPLICATIONS AU CANCER OVARIEN 14

II.1. La culture cellulaire en 2D : des avantages mais aussi des limites *14*

II.1.1. Définition et historique 14

II.1.2. Les avantages de la culture cellulaire en 2D 15

II.1.3. Les limites de la culture cellulaire en 2D 16

II.2. La culture cellulaire en 3D *18*

II.2.1. Introduction 18

II.2.2. Les sphéroïdes multicellulaires et les sphéroïdes tumoraux 19

II.2.3. Les organoïdes 30

II.2.4. La bio-impression 3D 43

II.2.5. Discussion générale des approches de culture cellulaire en 3D 62

III. LA MICROFLUIDIQUE ET LA TECHNOLOGIE OOC / COC 63

III.1. De la microfluidique aux OoC *63*

III.2. Définition des OoC et des CoC *65*

III.3. Les matériaux pour la fabrication des OoC/CoC *65*

III.3.1. Le Polydiméthylsiloxane ou PDMS 65

III.3.2. Les alternatives au PDMS 68

III.4. Les procédés de fabrication des OoC/CoC *68*

III.5. Application de la technologie des CoC à la modélisation du cancer ovarien *69*

III.6. Autres exemples d'application de la technologie des CoC *71*

III.7. Les systèmes microfluidiques générateurs de gradients *81*

IV. CONCLUSIONS DU VOLET BIBLIOGRAPHIQUE 83

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES 85

CHAPITRE 2 : MATERIEL ET METHODES 105

INTRODUCTION 105

I. ETABLISSEMENT D'UN MODELE D'UNE TUMEUR OVARIENNE PAR BIO-IMPRESSION 3D 106

I.1. Définition et optimisation de la composition de la bio-encre *106*

I.1.1. La composition qualitative de l'hydrogel 107

I.1.2. La composition quantitative de l'hydrogel 107

I.2. Conception et optimisation des fichiers informatiques nécessaires à la bio-impression *109*

I.3. Préparation des modèles bio-imprimés *110*

I.3.1. Réactifs et matériel utilisé 111
I.3.2. Lignées cellulaires et culture cellulaire 112
I.3.3. Préparation des structures bio-imprimées contenant des cellules 112
I.4. Caractérisations biologiques des modèles bio-imprimés 119
I.4.1. Evaluation de la viabilité cellulaire 119
I.4.2. Evaluation de l'activité métabolique des cellules au sein des structures bio-imprimées 120
I.4.3. Distribution spatiale des cellules au sein des structures bio-imprimées 125
I.4.4. Caractérisation histologique 126
I.4.5. Marquages immunologiques 127
I.4.6. Imagerie longitudinale 130
II. COMPORTEMENT DU MODELE TUMORAL BIO-IMPRIME VIS-A-VIS D'UN MEDICAMENT ANTICANCEREUX : LE CISPLATINE 131
II.1. Mise en place de la technique WST-1 132
II.1.1. En 3D (pour les structures bio-imprimées) 132
II.1.2. En 2D (en monocouche) 132
II.2. Description des études réalisées 132
II.2.1. Etude de l'impact de la bio-impression 3D sur les réponses cellulaires au cisplatine 132
II.2.2. Etude de l'impact de la combinaison des deux types cellulaires 133
II.2.3. Etude de l'impact du temps sur les réponses cellulaires au cisplatine 134
II.3. Traitement des résultats 135
III. INTEGRATION DU MODELE TUMORAL BIO-IMPRIME AU SEIN D'UN SYSTEME MICROFLUIDIQUE 136
III.1. Conception du système microfluidique mono-serpentin 136
III.1.1. Design du système mono-serpentin 136
III.1.2. Fabrication du système mono-serpentin 138
III.2. Intégration du modèle bio-imprimé au sein du système mono-serpentin 141
III.3. Conception du système microfluidique à 5 serpentins 142
III.3.1. Définition de la mécanique des fluides numérique (CFD) 144
III.3.2. Le logiciel Ansys Fluent 144
III.3.3. Application de la CFD dans le cadre de la conception du système à 5 serpentins 144
III.3.4. Validation expérimentale des premiers prototypes du système à 5 serpentins 145
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 148

CHAPITRE 3 : ETABLISSEMENT D'UN MODELE TRIDIMENSIONNEL D'UNE TUMEUR OVARIENNE PAR BIO-IMPRESSION 3D 150

INTRODUCTION 150
I. RESULTATS ET DISCUSSION 151
I.1. Définition et optimisation de la formulation de la bio-encre 151
I.1.1. Formulation qualitative de l'hydrogel 151
I.1.2. Formulation quantitative de l'hydrogel 153
I.2. Optimisation des fichiers informatiques nécessaires à la bio-impression 154
I.3. Préparation des modèles bio-imprimés 157
I.3.1. Choix des types et des lignées cellulaires 157
I.3.2. Les vérifications préalables à la bio-impression 158
I.3.3. Bio-impression des structures contenant des cellules 158
I.4. Caractérisations biologiques des structures bio-imprimées 160
I.4.1. Evaluation de la viabilité cellulaire 160
I.4.2. Mesure de l'activité métabolique au sein des structures bio-imprimées 162
I.4.3. Distribution spatiale des cellules dans les structures bio-imprimées 165
I.4.4. Analyse histologique 166
I.4.5. Imagerie longitudinale 170
I.4.6. Marquages immunologiques 172
I.5. Discussion globale 176
II. LIMITES DE CETTE ETUDE ET PERSPECTIVES DE RECHERCHES ASSOCIEES 177
III. CONCLUSION DU 3EME CHAPITRE 179
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 180

CHAPITRE 4 : COMPORTEMENT DU MODELE TUMORAL BIO-IMPRIME VIS-A-VIS D'UN MEDICAMENT ANTICANCEREUX : LE CISPLATINE 183

INTRODUCTION 183
1. Approches d'étude de la pertinence des modèles 3D du cancer ovarien 184
1.1. L'évaluation de la viabilité cellulaire 185
1.2. Les études histologiques 185
1.3. Les marquages immunologiques 185
1.4. Les caractérisations génétiques 185
2. Analyse de quelques exemples bibliographiques 186
3. Objectifs du 4ème chapitre de thèse 190
I. RESULTATS ET DISCUSSION 191
I.1. Effet de la bio-impression 3D sur les réponses cellulaires au cisplatine 191
I.1.1. Pour les SKOV-3 192
I.1.2. Pour les MeWol 194
I.2. Effet de la combinaison des deux types cellulaires 195
I.2.1. Impact de la coculture en 2D 195
I.2.2. Impact de la coculture en 3D 197
I.3. Etude de l'impact du temps sur les réponses au cisplatine 200
II. LIMITES DE CETTE ETUDE ET PERSPECTIVES DE RECHERCHE ASSOCIEES 202
III. CONCLUSION DU 4EME CHAPITRE 204
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 205

CHAPITRE 5 : INTEGRATION DU MODELE TUMORAL BIO-IMPRIME AU SEIN D'UN SYSTEME MICROFLUIDIQUE 208

INTRODUCTION 208
1. Contexte bibliographique 208
2. Objectifs du 5ème chapitre de thèse 210
I. RESULTATS ET DISCUSSION 211
I.1. Conception du système microfluidique mono-serpentin 211
I.1.1. Design du système mono-serpentin 211
I.1.2. Fabrication du système mono-serpentin 213
I.2. Intégration du modèle tumoral bio-imprimé au sein du système mono-serpentin 214
I.3. Conception du système microfluidique à cinq serpentins 217
I.3.1. Rappel des objectifs à atteindre 217
I.3.2. Le système à 2 entrées et 5 sorties (2E5S) 219
I.3.3. Le système à 6 entrées et 5 sorties (6E5S) 220
I.3.4. Influence de la concentration et de la nature du soluté 225
I.3.4. Validation expérimentale des premiers prototypes du système à cinq serpentins 228
II. LIMITES DE CETTE ETUDE ET PERSPECTIVES DE RECHERCHE ASSOCIEES 232
II.1. Introduction 232
II.2. Les limites associées à la conception des systèmes microfluidiques 233
II.2.1. La longueur du trajet vasculaire 233
II.2.2. La taille de la section du canal en serpentin 233
II.2.3. Le niveau de la contrainte de cisaillement 233
II.2.4. Perspectives d'amélioration 235
II.3. Les limites associées à la fabrication et à la manipulation des systèmes microfluidiques 236
II.3.1. Les fuites entre le système et son couvercle 236
II.3.2. Les fuites aux points d'insertion des aiguilles d'entrée et de sorties 237
II.3.3. Les autres anomalies de progression du fluide dans les systèmes (sans relation avec des fuites) 238
III. CONCLUSION DU 5EME CHAPITRE 242
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 243

CONCLUSION GENERALE 246

PERSPECTIVES DE RECHERCHE 249

1. Par rapport au modèle tumoral ovarien bio-imprimé en 3D 249
1.1. Les axes d'amélioration 249
1.2. Les questions à explorer 250
2. Par rapport à la réponse du modèle bio-imprimé au cisplatine 250
3. Par rapport à l'intégration des modèles bio-imprimés au sein de supports microfluidiques 251

RESUME 253

SUMMARY 254

Liste des figures

FIGURE 1.1. LES DIFFERENTS TYPES DE CANCERS OVARIENS[26]. 8
FIGURE 1.2. LES CARACTERISTIQUES HISTOLOGIQUES DU HGSC[17]. 10
FIGURE 1.3. LES CARACTERISTIQUES CYTOLOGIQUES DU HGSC[17]. 11
FIGURE 1.4. MARQUAGES IMMUNOLOGIQUES POUR LA CARACTERISATION DU HGSC[17]..... 13
FIGURE 1.5. PRINCIPE DE L'APPROCHE DES PLAQUES A SURFACE ANTIADHESIVE[88]. 21
FIGURE 1.6. PRINCIPE DE LA METHODE DE LA GOUTTE SUSPENDUE[90]. 22
FIGURE 1.7. LES DISPOSITIFS UTILISES DANS L'APPROCHE PAR AGITATION[92]. 23
FIGURE 1.8. ANALYSE HISTOLOGIQUE DES ORGANOÏDES CANCEREUX OVARIENS GENERES DANS L'ETUDE DE GORSKI ET AL[131]. 39
FIGURE 1.9. PRINCIPE ET VARIANTES DE LA BIO-IMPRESSION PAR EXTRUSION[162]. 45
FIGURE 1.10. BIO-IMPRIMANTE A EXTRUSION COMMERCIALE AVEC TROIS TETES D'IMPRESSION[174]..... 48
FIGURE 1.11. PRINCIPE DE LA BIO-IMPRESSION A JET D'ENCRE[180]. 49
FIGURE 1.12. PRINCIPE DE LA BIO-IMPRESSION ASSISTEE PAR LASER[10]. 50
FIGURE 1.13. PRINCIPE DE LA STEREOLITHOGRAPHIE[10]. 51
FIGURE 1.14. LE MONTAGE EXPERIMENTAL DECRIT DANS L'ETUDE DE XU *ET AL.*[186]. 53
FIGURE 1.15. SCHEMA ET ETAPES D'ELABORATION DU MODELE DECRIT PAR NEUFELD *ET AL.*[7]. 57
FIGURE 1.16. LE MODELE DE MYELOME MULTIPLE DECRIT PAR WU *ET AL.*[194]. 60
FIGURE 1.17. LE MODELE DE POUMON SUR PUCE DEVELOPPE PAR HUH *ET AL*. [218]. 64
FIGURE 1.18. STRUCTURE CHIMIQUE DU POLYDIMETHYLSILOXANE (PDMS)[223]. 66
FIGURE 1.19. ETAPES DE FABRICATION D'UN SYSTEME MICROFLUIDIQUE *VIA* UN PROCEDE DE MOULAGE[230]. 68
FIGURE 1.20 . SCHEMA DU MODELE DECRIT PAR FLONT ET AL.[238]. 70
FIGURE 1.21. LE MODELE DEVELOPPE PAR HACHEY *ET AL*.[6]. 78
FIGURE 1.22 . SCHEMA DU DISPOSITIF DEVELOPPE EN 2000 PAR JEON ET AL[294]. 82

FIGURE 2.23. PRINCIPE DE LA RETICULATION DE L'ALGINATE EN PRESENCE D'IONS CALCIUM[2]. 117
FIGURE 2.24. DESIGN DU SYSTEME MICROFLUIDIQUE MONO-SERPENTIN. 137
FIGURE 2.25. MOULE UTILISE POUR FABRIQUER LE SYSTEME MONO-SERPENTIN. 139
FIGURE 2.26. DESIGN DU SYSTEME MICROFLUIDIQUE A CINQ SERPENTINS. 143
FIGURE 2.27. LE MOULE UTILISE POUR FABRIQUER LA VERSION ADAPTEE DU SYSTEME 5 SERPENTINS. 147

FIGURE 3.28. RESULTATS DES ESSAIS D'IMPRESSION REALISES DURANT LA PHASE D'OPTIMISATION DE L'HYDROGEL[5]. 154
FIGURE 3.29 . RESULTAT D'IMPRESSION A PARTIR D'UN FICHIER .STL. 155
FIGURE 3.30. SIMULATION CAMOTICS DU FICHIER .GCODE GENERE PAR LA BIO-IMPRIMANTE. 156
FIGURE 3.31. FICHIER .GCODE OBTENU A L'ISSUE DE LA PHASE D'OPTIMISATION. 157
FIGURE 3.32. COCULTURE EN 2D DES DEUX TYPES CELLULAIRES. 158
FIGURE 3.33. DEROULEMENT DES MANIPULATIONS DE BIO-IMPRESSION ET PHOTO DES STRUCTURES BIO-IMPRIMEES[5]. 159
FIGURE 3.34. EVALUATION DE LA VIABILITE CELLULAIRE PAR LA TECHNIQUE LIVE/DEAD EN LA MICROSCOPIE CONFOCALE[5]. 160
FIGURE 3.35. PREMIERE EVALUATION DE LA VIABILITE CELLULAIRE PAR LA TECHNIQUE WST-1. 162
FIGURE 3.36. DEUXIEME EVALUATION DE LA VIABILITE CELLULAIRE PAR LES TECHNIQUES WST-1 ET ALAMARBLUE[5]. 164
FIGURE 3.37. DISTRIBUTION SPATIALE DES CELLULES DANS LES STRUCTURES BIO-IMPRIMEES[5]. 166
FIGURE 3.38. ANALYSE HISTOLOGIQUE DES STRUCTURES BIO-IMPRIMEES PAR HES A J+1 APRES BIO-IMPRESSION[5]. 167
FIGURE 3.39. ANALYSE DES STRUCTURES BIO-IMPRIMEES PAR HES A J+1 ; J+3 ET J+7 APRES BIO-IMPRESSION[5]. 168
FIGURE 3.40. EVOLUTION DE LA TAILLE DES AGREGATS CELLULAIRES EN FONCTION DU TEMPS[5]. 169
FIGURE 3.41. IMAGERIE LONGITUDINALE APRES MARQUAGE DIFFERENT DES DEUX TYPES CELLULAIRES[5]. 171
FIGURE 3.42. EVALUATION DE DIFFERENTS MARQUEURS PAR IMMUNOHISTOCHIMIE A J+7 APRES BIO-IMPRESSION[5]. 173
FIGURE 3.43. EVALUATION DE L'EXPRESSION DU FAP SUR DES SECTIONS OBTENUES A J+7 APRES BIO-IMPRESSION[5]. 174

Figure 4.44. Strategie de l'etude menee par Brodeur *et al.*[11] en 2021. 188
Figure 4.45. Reponse au cisplatine des SKOV-3 en 2D et en 3D. 192
Figure 4.46. Reponse au cisplatine des MeWo en 2D et en 3D. 194
Figure 4.47. Reponse au cisplatine de la coculture en 2D. 196
Figure 4.48. Reponse au cisplatine de la coculture en 3D. 197
Figure 4.49. Reponse au cisplatine de la coculture 2D en comparaison avec la coculture 3D. 199
Figure 4.50. Cinetique de la reponse au cisplatine en 2D (en haut) et en 3D (en bas). 201

Figure 5.51. Design du systeme microfluidique mono-serpentin. 211
Figure 5.52. Dimensions cles du systeme mono-serpentin. 212
Figure 5.53. Systeme mono-serpentin obtenu apres fabrication et collage. 214
Figure 5.54. Montage experimental utilise pour la perfusion des tumeurs bio-imprimees. 215
Figure 5.55. Design du systeme microfluidique a cinq serpentins. 218
Figure 5.56. Resultats de la simulation 1 avec le systeme 2ES5. 219
Figure 5.57. Geometrie du systeme 6E5S. 220
Figure 5.58. Simulation 1 avec le systeme 6E5S. A. Conditions initiales. B. Resultats obtenus. 222
Figure 5.59. Simulation 2 avec le systeme 6E5S. A. Conditions initiales. B. Resultats obtenus. 223
Figure 5.60. Simulation 3 avec le systeme 6E5S. A. Conditions initiales. B. Resultats obtenus. 224
Figure 5.61. Simulation avec une solution S_M a 100 µg/mL. 226
Figure 5.62. Simulation avec C_M = 100 µg/mL et un coefficient de diffusion 1000 fois superieur. 227
Figure 5.63. Simulation avec C_M = 100 µg/mL et un coefficient de diffusion 1000 fois inferieur. 228
Figure 5.64. Systeme a 5 serpentins utilise pour la validation experimentale des resultats. 229
Figure 5.65. Resultats de la validation qualitative du systeme a 5 serpentins. 230
Figure 5.66. Montage experimental utilise pour valider le systeme a cinq serpentins. 231
Figure 5.67. Evaluation de la contrainte de cisaillement dans le systeme a cinq serpentins. 235
Figure 5.68. Simulation des valeurs de la pression statique a differents niveaux des serpentins. 240
Figure 5.69. Imperfections sur le moule qui se retrouvent sur le systeme en PDMS. 241

Liste des tableaux

Tableau 1.1. Marqueurs immunologiques appliques aux cancers ovariens. 12
Tableau 1.2. Exemples d'applications des spheroïdes a la recherche sur les cancers ovariens. 25
Tableau 1.3. Exemples de spheroïdes tumoraux ovariens pour l'evaluations d'outils therapeutiques..... 26
Tableau 1.4. Principaux facteurs de croissance utilises dans la culture des organoïdes cancereux. 32
Tableau 1.5. Exemples d'applications des organoïdes cancereux ovariens. 33
Tableau 1.6. application des organoïdes cancereux ovariens a l'evaluation d'outils therapeutiques. 34
Tableau 1.7. Comparaison des differentes techniques de bio-impression 3D[10]. 52
Tableau 1.8. Exemples d'application de la bio-impression 3D pour la creation de modeles cancereux..... 54
Tableau 1.9. Analyse d'exemples de modeles tumoraux bio-imprimes en 3D. 56
Tableau 1.10. Application de la technologie des CoC a l'etude du cancer ovarien. 69
Tableau 1.11. Exemples des domaines d'application de la technologie des CoC. 71
Tableau 1.12. Analyse d'exemples d'utilisation des CoC dans l'evaluation d'outils therapeutiques. 73

Tableau 2.13. Materiel et reactifs utilises dans la formulation de l'hydrogel 106
Tableau 2.14. Les differentes solutions preparees au cours de la phase d'optimisation de l'hydrogel 108
Tableau 2.15. Materiel et reactifs utilises dans la preparation des modeles tumoraux contenant des cellules 111
Tableau 2.16. Composition des bio-encres utilisees dans cette etude. 114
Tableau 2.17. Les parametres appliques pour la bio-impression des modeles tumoraux 116
Tableau 2.18. Composition du milieu de culture en fonction de la bio-encre utilisee 118
Tableau 2.19. Caracteristiques et provenance des anticorps utilises en immunohistochimie..... 128

Tableau 5.20. Viabilite des tumeurs bio-imprimees apres integration au sein du systeme mono-serpentin. 216
Tableau 5.21. Proprietes du solvant et du solute prises en compte pour les simulations avec le systeme 6E5S. 221

Liste des abréviations

2D	Deux dimensions
2E5S	Système à 2 entrées et 5 sorties
3D	Trois dimensions
4E5S	Système à 4 entrées et 5 sorties
6ES5	Système à 6 entrées et 5 sorties
ADAM 17	A disintegrin and metalloprotease 17
ARN	Acide Ribonucléique
ASC	Adult Stem Cells
ATCC	American Type Culture Collection
BME	Basement Membrane Extract
BMP	Bone Morphogenetic Protein
CAF	Cancer-Associated Fibroblasts
Calcéine-AM	Calcéine-acetoxtméthyle
CAO	Conception Assistée par Ordinateur
CFD	Computational Fluid Dynamics
CK20	Cytokératine 20
CK7	Cytokératine 7
CoC	Cancer-on-chip
CDKN2A	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A
DLP	Digital Light Processing
ECM	Extracellular Matrix
EDTA	Acide Éthylènediaminetétraacétique
EtHD-1	Ethidium Homodimère 1
FAP	Fibroblast Activation Protein
GelMA	Gélatine-méthacryloyl
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HGSC	High Grade Serous Carcinoma
HNF 1-β	Hepatocyte Nuclear Factor 1- Beta
IARC	International Agency for Research on Cancer
IC_{50}	Concentration inhibitrice 50
IF	Immunofluorescence
IHC	Immunohistochimie
IL-6	Interleukine 6
EGF	Epidermal Growth Factor
LRG5	Leucine-Rich Repeat-containing G-protein coupled Receptor 5
MAC	Membrane Alvéolo-Capillaire
MCS	Multicellular Spheroids
MCTS	Multicellular Tumor Spheroids
MEM	Minimal Essential Medium
OCOM-1	Ovarian Cancer Organoid culture Medium-1
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
OoC	Organ-on-chip
PAX8	Paired box gene 8
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PDX	Patient-Derived Xenograft
Poly(HEMA)	Poly-2-hydroxyethyl methacrylate
PTFE	Polytétrafluoréthylène
SATT	Société d'Accélération de Transfert de Technologies

SOX10	SRY-related HMG-box 10
TME	Tumor Microenvironment
TP53	Tumor Protein 53
TPP	Two-Photon Polymerization
TROC	Taux de Réussite des Cultures d'Organoïdes
USA	United States of America
WST-1	Water Soluble Tertrazolium 1
WT1	Wilms Tumor Gene 1

Introduction générale

Le terme « cancer » désigne un ensemble de maladies pouvant toucher quasiment tous les organes et tissus du corps. Elles sont dues à **une prolifération incontrôlée de cellules devenues anormales**. Ces dernières envahissent alors les tissus et les organes sains et compromettent leur fonctionnement. Ceci altère l'état de santé du patient et peut conduire à son décès[1].

Le cancer représente ainsi un véritable enjeu de santé publique. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), il a entrainé environ 10 millions de décès en 2020 constituant ainsi l'une des principales causes de mortalité dans le monde[2]. Malheureusement, l'incidence des pathologies cancéreuses est appelée à fortement augmenter au cours des prochaines années. Il est donc urgent d'améliorer notre arsenal thérapeutique pour mieux lutter contre ces pathologies.

En réalité, les traitements anticancéreux ont d'ores et déjà connu des progrès significatifs ces dernières décennies. Nous pouvons notamment évoquer le développement de l'immunothérapie ou de certaines thérapies ciblées[3,4]. Toutefois, ces avancées restent largement insuffisantes au regard de la diversité et de la complexité des maladies cancéreuses. Pour cette raison, la communauté scientifique continue à déployer des efforts considérables en vue de mettre au point de nouvelles molécules antitumorales.

Cependant, **le développement de ces nouvelles molécules se heurte à un taux d'échec très élevé d'environ 90%[5]. Ceci se répercute par des pertes financières considérables et constitue un frein aux nouveaux investissements en recherche et développement**. Ce fort taux d'échec des nouveaux médicaments anticancéreux est largement attribué **au manque de fiabilité et de prédictivité** des modèles précliniques utilisés pour les mettre au point[6].

Les premières études ***in vitro*** sur ces médicaments sont généralement effectuées en utilisant la cultures cellulaires dite en **deux dimensions ou (2D)**[7]. Or cette approche est de plus en plus remise en question en raison de sa **trop grande simplicité** par rapport à la complexité des structures tumorales[7]. En effet, dans une tumeur solide, les cellules évoluent dans un environnement tridimensionnel. Au sien de cet environnement, elles interagissent étroitement avec les cellules avoisinantes et les molécules de la matrice extracellulaire

(extracellular matrix ou (ECM) en anglais). Dans les cultures en 2D ces interactions sont peu (voire pas) représentées. Les comportements cellulaires observés en 2D peuvent alors être très différents de ceux ayant lieu *in vivo*.

Dans une seconde phase de leur développement, les candidats médicaments sont testés sur des modèles animaux pour évaluer leur efficacité et leur toxicité ***in vivo***[7]. Or ces modèles animaux présentent des différences phénotypiques et génotypiques par rapport à l'humain. Ceci pose, là encore, des problèmes de prédictivité et donc de fiabilité[6]. Par ailleurs, l'expérimentation animale soulève des problèmes éthiques et est de moins en moins acceptée par l'opinion publique[6].

Face à cette situation, la communauté scientifique s'est rendue compte **de la nécessité d'améliorer la performance des modèles précliniques utilisés en cancérologie**. L'objectif étant de développer de nouveaux outils susceptibles **de mieux refléter *in vitro* la complexité et la diversité des structures tumorales**. Dans cette perspective, la technologie de **culture cellulaire en trois dimensions (3D)** s'est rapidement imposée comme une piste de recherche prometteuse. Plusieurs variantes de cette technologie ont été explorées comme celle des **sphéroïdes** et des **organoïdes**. Ces outils ont permis d'améliorer la modélisation des tissus tumoraux. Cependant, leur application se heurte à plusieurs limites notamment en termes de coûts et de reproductibilité.

La modélisation tridimensionnelle des structures cancéreuses constitue également un champ d'application émergeant de la **bio-impression 3D**. C'est une technologie assistée par ordinateur qui offre de nombreux avantages par rapport aux autres approches de culture cellulaire en 3D. La bio-impression permet en effet de créer des modèles tumoraux avec une architecture contrôlée en combinant plusieurs types cellulaires avec des molécules de la matrice extracellulaire. L'organisation de ces éléments cellulaires et non cellulaires ainsi que les propriétés mécaniques de la matrice peuvent être ajustées au sein du modèle tumoral en fonction des besoins[8,9]. Ceci rend cette technologie particulièrement adaptée à la restitution de la complexité cellulaire et moléculaire du microenvironnement tumoral. La bio-impression assure enfin un bon niveau de reproductibilité. Il s'agit d'un avantage crucial qui peut faire défaut à d'autres approches notamment celle des sphéroïdes multicellulaires[8].

Les technologies de bio-impression 3D sont multiples. Elles comprennent notamment la bio-impression à jet d'encre, la bio-impression par extrusion et la bio-impression assistée par LASER[10]. Parmi ces techniques, la bio-impression par extrusion semble constituer un bon compromis entre possibilités techniques d'un côté et coût et facilité d'utilisation de l'autre. En effet et contrairement à la bio-impression à jet d'encre, l'extrusion permet d'imprimer des bio-encres avec une forte densité cellulaire (jusqu'à 10^8 cellules / mL) et est compatible avec un large choix de biomatériaux[10]. Ceci la rend mieux à même de reproduire l'hétérogénéité tumorale. D'un autre côté et contrairement à la bio-impression assistée par LASER, l'extrusion est aussi une technologie relativement peu coûteuse et facile à prendre en main[10]. Ceci la rend accessible à des équipes de recherche ayant peu d'expérience en bio-impression 3D.

Le potentiel de la bio-impression 3D commence à être exploité pour créer des modèles tumoraux. Néanmoins, très peu de travaux ont été effectué sur certains types cancéreux comme **le cancer ovarien**.

A côté des approches de culture cellulaire en 3D, l'introduction de la **technologie des cancers sur puce basée sur la microfluidique** a permis de franchir un nouveau cap dans la modélisation des tissus tumoraux. Grâce à cette technologie, il est devenu possible de prendre en compte certains aspects dynamiques associés au microenvironnement tumoral (flux sanguin, compression mécanique du tissu tumoral etc.). Les modèles de cancers sur puce actuels présentent néanmoins certaines limites. En particulier, ils ne permettent pas de simuler, en même temps, le trajet vasculaire du médicament et son interaction avec le tissu tumoral.

Donc, même si la modélisation tumorale a fortement progressé ces dernières années grâce à la culture cellulaire en 3D et à la microfluidique, il reste encore de nombreux obstacles à franchir et de nombreuses voies de recherche à exploiter. On se rend compte par exemple que ces technologies ont encore été peu appliquées à certains types cancéreux comme **le cancer ovarien**. Celui-ci constitue pourtant un grave problème de santé publique en raison de sa progression rapide et de son mauvais pronostic. Le développement de modèles fiables et pertinents du cancer ovarien est donc indispensable pour mettre au point de nouveaux traitements contre cette maladie.

C'est dans ce contexte que s'inscrit ce projet de thèse. Il vise à combiner les technologies de culture cellulaire en 3D et de microfluidique pour améliorer la modélisation préclinique du

cancer ovarien. Le but étant de créer un modèle tridimensionnel et dynamique d'une tumeur épithéliale ovarienne. A long terme, ce modèle sera utilisé pour évaluer l'activité de nouveaux outils thérapeutiques notamment des nanoparticules anticancéreuses développées au sein de l'Institut Jean Lamour.

Pour concevoir ce modèle, notre projet sera organisé en **deux axes principaux**. Nous allons, dans un premier temps, utiliser la bio-impression 3D pour créer un tissu tumoral ovarien tridimensionnel. Celui-ci sera caractérisé pour démonter sa viabilité et sa pertinence biologique. Le choix de la bio-impression se justifie par ses nombreux avantages évoqués plus haut.

Dans un second temps, le tissu tumoral ovarien bio-imprimé en 3D sera intégré au sein d'un support microfluidique permettant de le mettre en culture sous flux physiologique permanant. Le but étant de recréer l'une des dimensions dynamiques du microenvironnement tumoral. De plus, ce support microfluidique permettra de simuler le trajet vasculaire du médicament avant son interaction avec le tissu cancéreux.

Pour traiter ces deux axes, nous allons organiser ce manuscrit de thèse en 5 chapitres :

- ✓ Le premier chapitre sera dédié à une étude bibliographique. Celle-ci abordera notamment les différents modèles du cancer ovarien décrits actuellement et discutera leurs limites. Elle permettra aussi de contextualiser et de justifier notre démarche scientifique dans le cadre de cette thèse ;
- ✓ Le second chapitre sera consacré aux matériel et méthodes utilisés dans le cadre de cette thèse. Nous avons fait le choix de regrouper tous les aspects méthodologiques dans le second chapitre car nombre d'entre eux sont communs aux études expérimentales présentées dans les chapitres 3 à 5 ;
- ✓ Le troisième chapitre sera consacré à l'élaboration du tissu tumoral ovarien par bio-impression 3D et à sa caractérisation ;
- ✓ Dans le 4ème chapitre et pour approfondir la caractérisation du tissu tumoral bio-imprimé, nous étudierons son comportement vis-à-vis d'un médicament utilisé dans le traitement du cancer ovarien : le cisplatine. Les chapitres 3 et 4 correspondent donc au premier axe de travail (relatif au tissu tumoral bio-imprimé en 3D) ;

- ✓ Enfin dans le 5ème chapitre, nous discuterons de l'intégration du tissu tumoral bio-imprimé au sein du dispositif microfluidique. Ce chapitre sera donc consacré au deuxième axe de travail (relatif au support microfluidique).

A l'issue de ces cinq chapitres, nous aborderons la conclusion générale de cette thèse et nous décrirons les perspectives de recherche qui en découlent

Chapitre 1 : Etat de l'art

Introduction : Organisation de ce chapitre

Ce chapitre représente le volet bibliographique de ce manuscrit. Il est divisé en quatre grandes parties comme suit :

Dans la première partie, nous commencerons par **décrire le cancer ovarien**. Ce type cancéreux a été sélectionné comme exemple d'étude dans ce projet de thèse. Nous avons donc jugé utile de le définir à travers des données épidémiologiques, physiopathologiques et moléculaires. Cette partie est importante dans la mesure où elle permet de saisir l'enjeu de santé publique associé au cancer ovarien. Par ailleurs, les informations qui y sont présentées permettront au lecteur de comprendre nos choix et nos conclusions lors de caractérisations de notre modèle tumoral.

Dans les deuxième et troisième parties, nous décrirons les nouveaux modèles précliniques basés sur la culture cellulaire en 3D et la microfluidique. Chacune des technologies évoquées sera définie et illustrée à travers des exemples bibliographiques récents. Une attention particulière sera accordée à l'application de ces outils au cancer ovarien. Le but étant de permettre au lecteur de visualiser les avantages et les limites des modèles actuels et la plus-value de l'approche décrite dans cette thèse.

Enfin, dans la quatrième partie, nous évoquerons les conclusions globales de l'état de l'art et nous expliquerons comment elles ont contribué à fixer les axes de travail de cette thèse.

I. Les cancers ovariens

I.1. Données épidémiologiques

I.1.1. Au niveau international

Selon l'Agence internationale de Recherche sur le Cancer (International Agency for Research on Cancer ou (IARC) en anglais), plus de 313 000 nouveaux cas de cancers ovariens ont été enregistrés à travers le monde en 2020. Cette maladie a par ailleurs engendré plus de 207 000 décès durant cette même année[11,12]. Le cancer ovarien est ainsi le 7ème cancer le plus fréquent chez la femme et il constitue la 8ème cause de mortalité par cancer[13]. Par ailleurs selon les projections de l'IARC, l'incidence du cancer ovarien est amenée à progresser de 37% d'ici à 2040 où on s'attend à enregistrer plus de 428 000 nouveaux cas. La mortalité associée à cette pathologie progresserait quant à elle de plus de 50% d'ici à 2040 où on s'attend à enregistrer plus de 300 000 décès[13].

Cependant au-delà de son incidence, le cancer ovarien se caractérise surtout par une évolution souvent défavorable et une mortalité élevée[14,15]. Il est d'ailleurs souvent considéré comme étant le plus mortel des cancers gynécologiques[16,17]. En effet, le taux de survie à 5 ans du cancer ovarien varie entre 36% et 46% dans les pays développés[13]. A titre de comparaison, le taux de survie associé au cancer du sein se rapproche des 90%[13]. Par ailleurs, il est également à noter que le taux de survie du cancer ovarien a très peu progressé depuis les années 1980 contrairement à celui d'autres tumeurs solides[18].

I.1.2. En France

L'épidémiologie du cancer ovarien en France suit la tendance mondiale. Ainsi son incidence est relativement faible comparativement à celles d'autres types cancéreux mais son pronostic reste aussi relativement sombre[19]. Selon une étude publiée par l'Institut National du Cancer[20], le nombre de cas de cancers ovariens diagnostiqués en 2018 a été estimé à 5193. Le nombre de décès imputés à cette maladie a quant à lui été estimé à 3479. Le taux de survie à 5 ans pour les cas de cancers ovariens diagnostiqués entre 2010 et 2015 a été estimé à 43%[20]. A titre de comparaison, le taux de survie associé au cancer du sein a été estimé à 88% sur la même période selon Santé Public France[21].

L'évolution souvent défavorable du cancer ovarien peut être attribuée à plusieurs facteurs[22] :

- ✓ Le manque d'outils de dépistage et de marqueurs précoces ;

- ✓ La symptomatologie non spécifique associée aux cancer ovarien ;
- ✓ La dissémination métastatique rapide notamment au niveau abdominal après l'apparition des lésions primaires.

Ainsi le cancer ovarien constitue toujours un enjeu majeur de santé public tant à l'échelle mondiale qu'au niveau national.

I.2. Définition et diversité des cancers ovariens

Le terme « cancer ovarien » désigne en réalité un ensemble large et hétérogène de pathologies cancéreuses qui affectent les ovaires[23,24]. Il est d'ailleurs plus approprié de parler de cancer**s** ovarien**s** (au pluriel). Cette hétérogénéité peut être attribuée à l'extrême complexité histologique des ovaires[25]. Ceux-ci comprennent en effet dans leur structure plusieurs types cellulaires incluant notamment : des cellules épithéliales ; des cellules mésenchymateuses et des cellules germinales. Chacune de ces populations peut être à l'origine d'une prolifération néoplasique engendrant ainsi une grande diversité de tumeurs ovariennes. La Figure 1.1 présente les principaux types de cancers ovariens.

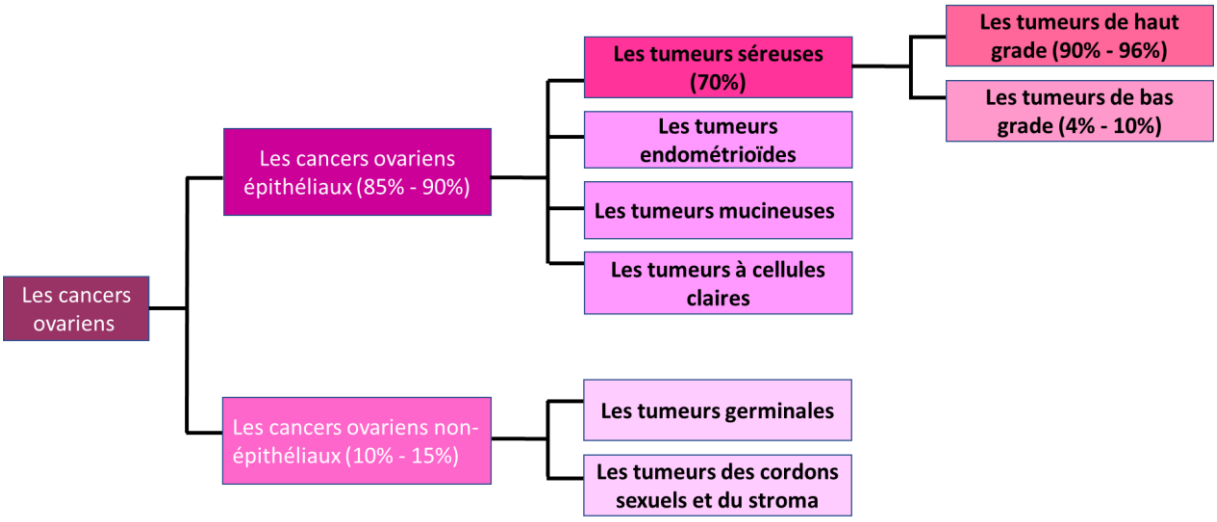


Figure 1.1. Les différents types de cancers ovariens[26].

Comme on peut le voir sur la Figure 1.1, les cancers ovariens peuvent globalement être classés en deux grandes catégories : les cancers ovariens épithéliaux (85% à 90% des cas) et les cancers ovariens non-épithéliaux (10% à 15% des cas)[26].

Parmi les tumeurs épithéliales, le cancer ovarien séreux de haut grade (ou carcinome séreux de haut grade ou High-Grade Serous Carcinoma (HGSC) en anglais) est le sous-type le plus fréquent et le plus léthal. En effet, il constitue 50% à 60% de l'ensemble des cancers de l'ovaire et est responsable de plus de 70% de la mortalité qui leurs est associée[26]. Par ailleurs, le HGSC est souvent diagnostiqué à des stades avancés ce qui explique son mauvais pronostic[27].

Comme le HGSC constitue l'entité pathologique la plus importante dans la panoplie des cancers ovariens, nous avons jugé utile de le décrire en détail à travers des données cliniques, anatomo-histologiques, cytologiques et moléculaires. Nous aborderons également les principaux axes de traitement du HGSC. Tous ces aspects seront abordés dans le paragraphe ci-dessous.

I.3. Le carcinome séreux de haut grade (HGSC)

I.3.1. Données cliniques

Le carcinome séreux de haut grade survient le plus souvent entre 60 et 80 ans. L'âge moyen de survenue étant de 63 ans selon la plupart des études[28]. La majorité des tumeurs sont diagnostiquées à des stades avancés avec envahissement des régions abdominale et pelvienne[29]. Ce diagnostic tardif peut notamment s'expliquer par la non-spécificité des premiers symptômes. Ceux-ci comprennent[28,29] :

- ✓ Des douleurs abdominales ;
- ✓ Des troubles digestifs (nausées et vomissements, diarrhées, constipations) ;
- ✓ Des troubles urinaires (polyuries, dysuries) ;
- ✓ Des saignements vaginaux.

Quand les symptômes deviennent plus sévères et plus évocateurs, la maladie s'est déjà souvent étendue à la cavité péritonéale[29]. Le tableau clinique peut alors comprendre une distension abdominale associée à la formation d'ascite[30] (présence anormale de liquide non sanglant qui s'accumule dans la cavité abdominale). A ce stade, des troubles respiratoires tels que toux et dyspnée peuvent également se manifester[31].

I.3.2. Caractéristiques anatomo-histologiques

Les carcinomes séreux de haut grade sont souvent de localisation bilatérale (66% des cas). Les tumeurs sont typiquement kystiques et solides avec des papilles molles et friables remplissant les cavités des kystes. Les kystes contiennent un liquide turbide ou sanguinolent. Leurs surfaces externes peuvent être lisses ou bosselées et présentent souvent des végétations[25,28].

A la coupe, les zones solides sont de coloration rose à grisâtre et de consistance molle ou ferme selon les caractéristiques du stroma tumoral. Souvent, on constate la présence de zones hémorragiques ou nécrotiques[28].

L'observation microscopique de coupes histologiques de HGSC révèle la présence de masses cellulaires solides avec une architecture complexe caractérisée notamment par un aspect « labyrinthique » et des fenestrations en forme de fentes. On note également la présence de structures d'aspect papillaire, glandulaire, ou cribriforme[17,28]. Ces caractéristiques sont évocatrices de l'architecture de l'épithélium des trompes de Fallope[17,25]. Par ailleurs, l'observation des coupes histologiques de HGSC met en évidence la présence de plages de nécrose fréquentes et étendues[17,25]. Les principales caractéristiques histologiques du HGSC sont représentées par la Figure 1.2.

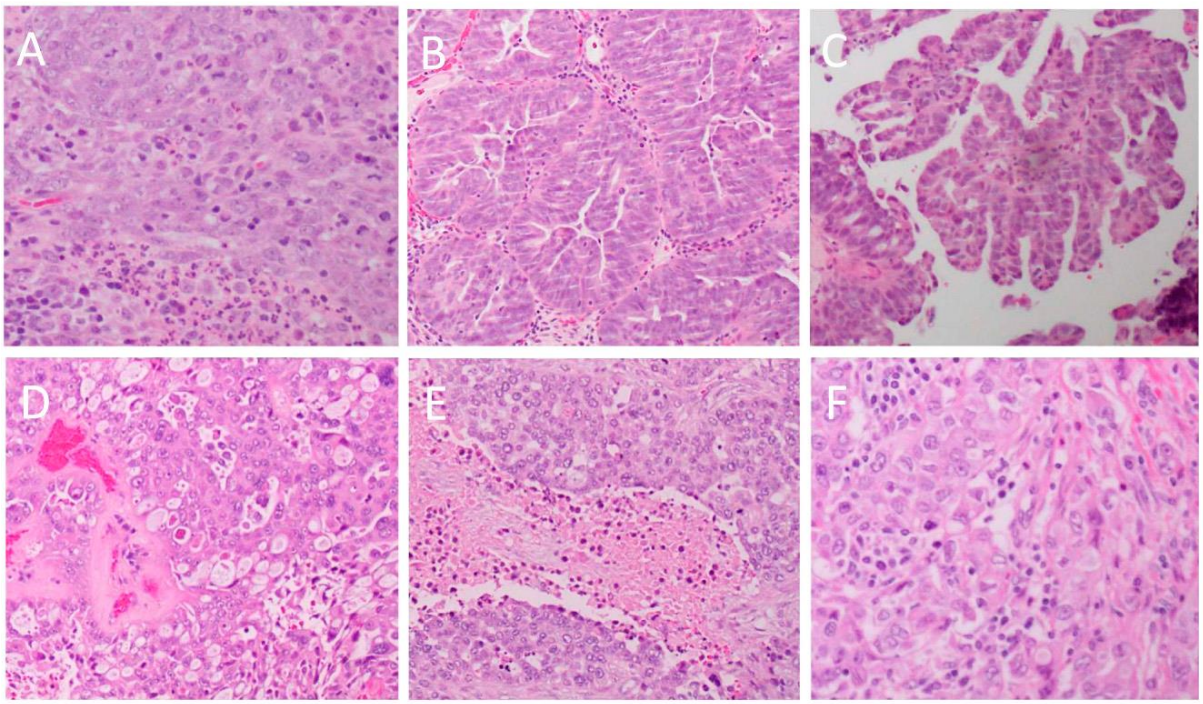


Figure 1.2. Les caractéristiques histologiques du HGSC[17]. A. Zone de croissance solide avec une forte densité cellulaire. B. Architecture glandulaire avec des espaces en forme de fente. C. Architecture papillaire. D. Architecture cribriforme. E. Présence de zones de nécrose dite « géographique. F. Zone de croissance solide avec infiltration de lymphocytes.

Sur le plan cytologique, les coupes de HGSC montrent des anomalies nucléaires fréquentes. Les noyaux cellulaires sont souvent volumineux, hyperchromatiques et pléomorphes (présentant plusieurs formes différentes). Des cellules géantes multinucléées peuvent

également être observées. Les nucléoles sont généralement proéminents et volumineux. L'indice mitotique est élevé avec une abondance de figures mitotiques d'aspect souvent atypique[17,28]. Par ailleurs, la présence de noyaux anormaux d'un diamètre de plus de 50 µm est caractéristique du HGSC[28].

Les principales caractéristiques cytologiques du HGSC sont représentées par la Figure 1.3.

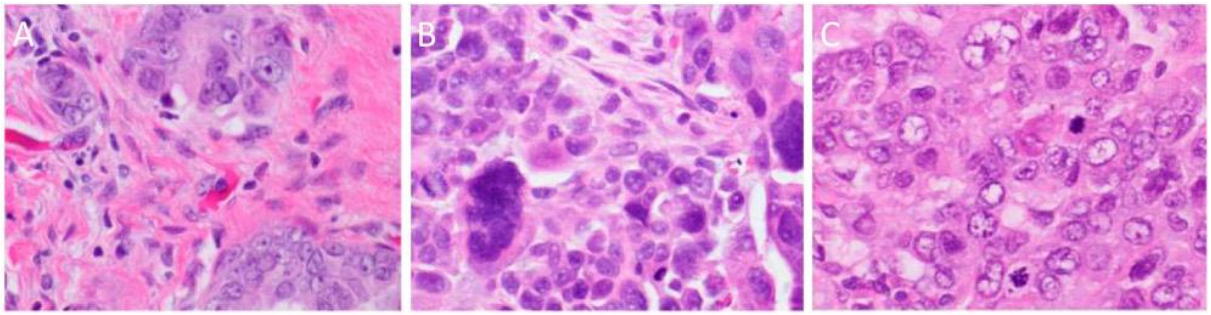


Figure 1.3. Les caractéristiques cytologiques du HGSC[17]. A. Présence de cellules géantes multinucléées. B. Pléomorphisme nucléaire et nucléoles proéminents. C. Présence de figures mitotiques.

I.3.3. Marqueurs immunologiques

A côté des caractéristiques morphologiques, un certain nombre de marqueurs immunologiques sont utilisés pour caractériser le carcinome séreux de haut grade et le distinguer, notamment, des autres cancers ovariens épithéliaux. Nous pouvons résumer cela de la manière suivante :

- **Marquage à l'anti-p53**

A l'inverse des carcinomes séreux dits « de bas grade », les HGSC comportent très souvent des mutations du gène TP53 (50% à 80% des cas voire plus selon les références)[28,32]. En fonction du type de la mutation en question, le marquage immunologique à l'anticorps anti-P53 peut être (i) soit fortement positif quand il s'agit de mutations générant des protéines anormales et non fonctionnelles (cas le plus fréquent). Ou (ii) négatif quand les mutations affectant le gène TP53 génèrent des protéines tronquées non reconnues par l'anticorps anti-p53[17].

- **Marquage à l'anti-Ki-67 et index de prolifération**

L'évaluation de la prolifération cellulaire est souvent déterminée grâce à un marquage immunologique ciblant l'antigène Ki-67[33]. Celui-ci est exprimé par les cellules prolifératives.

On définit alors l'index de prolifération comme étant le pourcentage de cellules positives au marquage à l'anti-Ki-67 au sein d'une population cellulaire[33]. Dans les carcinomes séreux de haut grade, cet index est plus élevé que dans les tumeurs épithéliales de bas grade[34].

- **Autres marqueurs d'intérêt**

A côté du p53 et du Ki-67, d'autres marqueurs sont utilisés pour caractériser le HGSC. Bien entendu, c'est toujours l'association de plusieurs marquages qui permet d'affiner le diagnostic. Nous résumons dans le Tableau 1.1 ci-dessous certains des marqueurs utiles dans la caractérisation du carcinome séreux de haut grade :

Tableau 1.1. Marqueurs immunologiques appliqués aux cancers ovariens.

Marqueur(s)	**Intérêt dans la caractérisation du carcinome séreux de haut grade**
Wilms Tumor Gene 1 (WT1)	Le marquage anti-WT1 est plus souvent positif dans les HGSC comparativement aux carcinomes séreux de bas grade[35].
Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A (CDKN2A) ou protéine p16	Le marquage anti-p16 est intense et présent dans quasiment 100% des cellules au sein des HGSC. Il est, au contraire, plus rare et moins intense dans les carcinomes séreux de bas grade[35,36].
Cytokératine 7 (CK7) et Cytokératine 20 (CK20)	Le marquage anti-CK7 est souvent positif alors que le marquage anti-CK20 est généralement négatif dans les carcinomes ovariens séreux[22].
Hepatocyte Nuclear Factor 1-Beta (HNF1-β)	Le marquage anti-HNF1- β est négatif dans le HGSC. Ceci constitue un critère de distinction par rapport au carcinome ovarien à cellules claires où ce marquage est positif[37].
Paired box gene 8 (PAX8)	Marqueur souvent positif pour tous les cancers ovariens épithéliaux (dont le HGSC). Sa détection évoque très fortement le phénotype épithélial de la tumeur[38].

La Figure 1.4 représente certains des marquages immunologiques souvent effectués pour caractériser le HGSC.

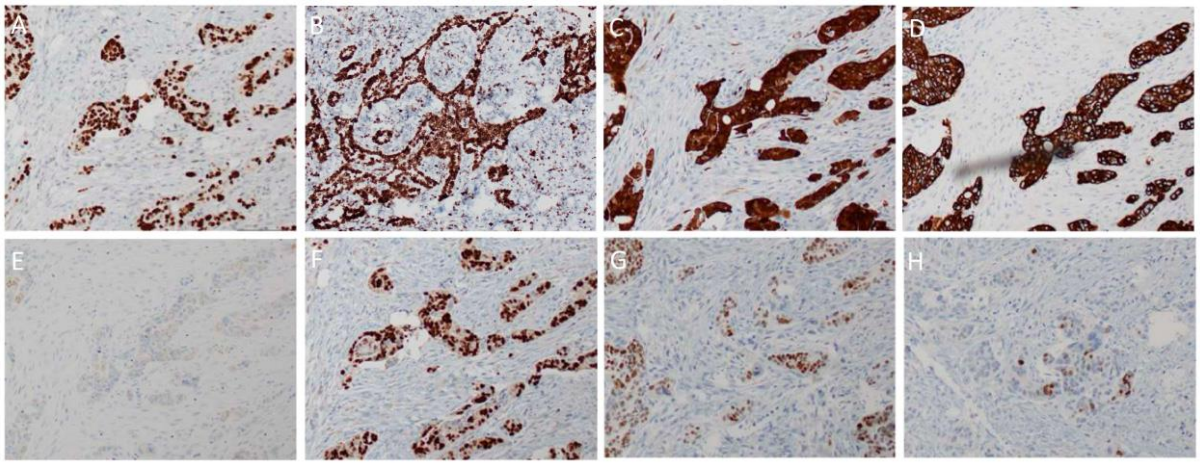


Figure 1.4. Marquages immunologiques pour la caractérisation du HGSC[17]. A. Anti-P53. B. Anti-WT1. C. Anti-p16. D. Anti-CK7. E. Anti-CK20. F. Anti-PAX8. G. Anti-ER (Récepteur à l'Œstrogène). H. Anti-PR (Récepteur à la Progestérone).

I.3.4. Caractéristiques moléculaires

Les mutations du gène TP53 sont considérées comme le marqueur moléculaire majeur des carcinomes séreux de haut grade[28].

I.3.5. Prise en charge et traitements

En général, le traitement du HGSC est d'abord chirurgical. Il consiste à retirer la plus grande partie possible de la masse tumorale[39]. La patiente reçoit ensuite une cure de chimiothérapie dite « adjuvante ». Le but en est de d'éliminer les cellules cancéreuses résiduelles pour pallier le risque de récidive. Cette cure de chimiothérapie combine généralement deux molécules cytotoxiques : un sel de platine (Ex. Cisplatine ou carboplatine) et un taxane (Ex. Paclitaxel)[39]. Le cisplatine, le carboplatine et le paclitaxel occupent donc une place centrale dans la prise en charge médicamenteuse du HGSC. En dépit de la combinaison (chirurgie + chimiothérapie), la majorité des patientes font une rechute dans les 3 ans suivant la fin de traitement[39]. Ce risque très élevé de rechute est fortement associé au mauvais pronostic du HGSC.

II. Les techniques de culture cellulaire en 3D et leurs applications au cancer ovarien

II.1. La culture cellulaire en 2D : des avantages mais aussi des limites

II.1.1. Définition et historique

La culture cellulaire en 2D ou en **monocouche** consiste à mettre en culture des cellules en couche unique sur un support solide auquel elles s'attachent pour former un « tapis cellulaire »[40].

Cette définition s'applique pour les cellules adhérentes qui constituent la majorité des types cellulaires[41]. Les cellules non adhérentes, quant à elles, sont cultivées sur les mêmes supports mais, au lieu de s'y attacher, elles restent en suspension dans le milieu de culture[41].

Les supports utilisés pour la culture cellulaire en 2D varient en fonction des applications envisagées. Il peut s'agir soit de boites de Pétri, de plaques à puits ou de flasques de culture cellulaire de différentes tailles. Ces supports sont fabriqués en verre ou, plus souvent, en polystyrène[42].

Les premières tentatives de maitriser la culture cellulaire *in vitro* remontent à la fin du XIXème siècle. En 1885, Wilhelm Roux (1850 – 1924) a démontré la possibilité de maintenir des cellules d'embryon de poulet en vie pendant quelque jours dans un tampon salin[43]. A l'aube du XXème siècle, l'embryologiste américain Ross Granville Harrison (1870–1959) a développé une technique permettant la culture de fragments embryonnaires de grenouilles[44]. Il a par ailleurs introduit la notion d'asepsie en culture cellulaire. Ceci lui a permis de réduire l'incidence des contaminations bactériennes et d'allonger significativement la durée de vie de ses cultures[44].

Alexis Carrel (1873–1944) et ses collaborateurs ont par la suite adapté la technique de Harrison pour cultiver des cellules cardiaques d'embryons de poulets. En Janvier 1912, ils ont rapporté que leurs cultures cellulaires semblaient « immortelles ». En effet, ces cellules semblaient pouvoir se renouveler indéfiniment *in vitro*[45,46]. Cette découverte avait alors entrainé un tollé au sein de la communauté scientifique. En Janvier 1924, Le *New-York Tribune*, un journal américain, avait même publié un article célébrant le douzième anniversaire de la mise en culture de ces cellules[45]. Ces résultats ont depuis été remis en question notamment suite aux découvertes de Leonard Hayflick (1928 – Présent). Ce dernier a démontré en effet que les cellules normales (saines) meurent inéluctablement après un nombre limité de

divisions[47,48]. Les travaux de Carrel ont néanmoins ouvert la voie à de nouvelles innovations en matière de culture cellulaire. Par exemple, les premières flasques de culture cellulaire en verre ont fait leur apparition en 1923[44].

Les premières cellules **humaines véritablement immortelles** (car cancéreuses) ont été isolées en 1951 par George Gey (1899 – 1970)[49]. Il les a obtenues à partir d'une biopsie sur un cancer du col de l'utérus chez une patiente afro-américaine du nom de Henrietta Lacks. Gey a alors établi **la première lignée cellulaire humaine** : La lignée **HeLa** qui est encore largement utilisée de nos jours[49]. De très nombreuses autres lignées ont été développées par la suite et leur usage s'est rapidement répandu[50].

A partir des années 1950, la culture cellulaire, le plus souvent réalisée en monocouche[42], est rapidement devenue un outil indispensable dans un grand nombre de domaines comprenant : la recherche fondamentale en biologie[40] ; le développement de nouvelles molécules thérapeutiques[51] ; la synthèse de vaccins et de protéines recombinantes[52] ; la recherche en cancérologie[52] etc.

Cette très large utilisation de la culture cellulaire en 2D explique d'ailleurs un certain nombre de ses avantages comme nous allons le voir dans le point suivant.

II.1.2. Les avantages de la culture cellulaire en 2D

La culture cellulaire en 2D présente un certain nombre d'avantages qui découlent en partie de sa très large utilisation depuis relativement longtemps[52]. Ceci a permis à la communauté scientifique de mettre au point des outils et des protocoles expérimentaux bien standardisés et adaptés à ce mode de culture cellulaire[53]. Ceci simplifie les manipulations tout en réduisant les couts des expérimentations[52,54,55]. Par exemple, les cellules cultivées en 2D sont très facilement accessibles à l'observation et à l'imagerie microscopique avec des outils simples. A l'inverse, des dispositifs plus complexes sont souvent requis lorsque les cellules sont cultivées en 3D[56]. Par ailleurs, la culture cellulaire en 2D est adaptée à un très grand nombre de types cellulaires différents. Elle peut donc être appliquée à plusieurs domaines de recherche[52].

Mais au-delà de ces aspects « pratiques », la culture cellulaire en 2D présente aussi un avantage historique certain. La communauté scientifique dispose en effet d'une très grande quantité de données issues de l'usage de cette technique[54,55]. Toutes ces données constituent

donc une base de comparaison importante pour évaluer et contextualiser les résultats des nouvelles études.

Ces éléments expliquent probablement pourquoi la culture cellulaire en 2D est encore très utilisée de nos jours en dépit de ses limites que nous décrivons dans le point suivant.

II.1.3. Les limites de la culture cellulaire en 2D

En dépit de ses avantages techniques et historiques, la culture cellulaire en 2D présente un certain nombre de limites. Celles-ci sont essentiellement associées à **son incapacité à refléter la complexité des tissus humains (sains et cancéreux)**[57–59]. Cela peut être illustré à travers les points suivants :

- ✓ En culture 2D, le cytosquelette subit des réarrangements conduisant les cellules à adopter une morphologie aplatie[60]. Cette morphologie se caractérise par l'apparition d'un pôle apical exposé au milieu de culture et d'un pôle basal en contact avec le support solide. Il s'agit donc d'une **polarité artificielle** induite par les conditions de culture[60]. Or cette polarité modifie certains processus cellulaires clés notamment l'expression génétique et la synthèse des protéines[61]. Par exemple, la biosynthèse des enzymes métabolique est perturbée en culture 2D. Or ces enzymes jouent un rôle essentiel dans les réponses cellulaires aux agents pharmacologiques[53] ;
- ✓ Les cellules cultivées en 2D développent peu d'interactions intercellulaires[40,52]. Ceci s'explique par la configuration en deux-dimensions où chaque cellule ne peut interagir physiquement qu'avec ses voisines immédiates sur le même plan. A l'inverse, les tissus humains (sains et cancéreux) se caractérisent par un environnement tridimensionnel dans lequel plusieurs types cellulaires interagissent étroitement[62] ;
- ✓ Dans les cultures 2D, les cellules sont privées d'interactions avec les molécules de la matrice extracellulaire (Extracellular Matrix ou ECM en anglais)[40]. Or ces interactions sont cruciales pour moduler un très grand nombre de fonctions y compris : la prolifération[63,64] ; la différentiation[64] ; l'adhésion et la migration ainsi que la mort cellulaire[63,64]. La matrice extracellulaire peut donc influencer les réponses cellulaires aux xénobiotiques[65]. Dans les tissus cancéreux en particulier, les interactions (cellules tumorales – ECM) sont d'une importance capitale car elle modulent la migration et la métastase des cellules cancéreuses[66] ;

- ✓ Les cultures cellulaires en 2D ne présentent pas une architecture ou une organisation spécifique[40]. A l'inverse au sein des tissus et organes humains, les cellules sont disposées selon une architecture très précise. Très souvent, cette architecture est même étroitement liée à la fonction du tissu ou de l'organe en question. Par exemple, au sein de l'ovaire, on distingue 2 zones histologiques différentes : une zone corticale et une zone médullaire. Chacune de ces zones possédé une composition spécifique en termes de cellules et une fonction différente[67] ;
- ✓ Les cellules cultivées en 2D sont exposées à l'oxygène, aux nutriments et aux facteurs de croissance de manière homogène[68]. Or ceci ne reflète pas forcément la réalité observée *in vivo*[52,69]. Par exemple, on observe la présence de régions hypoxiques au centre des tumeurs solides car les cellules y sont peu exposées à l'oxygène et aux nutriments[53]. Ces régions hypoxiques peuvent influencer la progression des tumeurs et leurs réponses aux thérapies[70].

A travers ces éléments, il apparait que la culture cellulaire en 2D offre un aperçu très restreint de la réalité biologique telle qu'observée *in vivo*. Elle est notamment incapable de reproduire la complexité du microenvironnement tumoral[71] (Tumor Microenvironment ou TME en anglais).

Plus spécifiquement, des éléments influençant les réponses des cellules aux agents anticancéreux *in vivo* n'interviennent pas sur des cellules cultivées en 2D. Ceci compromet la fiabilité de cet outil préclinique et sa capacité à prédire les réponses aux agents thérapeutiques[53].

L'usage de la culture cellulaire en 2D en tant que modèle préclinique peut ainsi parfois conduire à l'obtention de résultats faussement prometteurs quant à l'efficacité et/ou la toxicité *in vivo* des molécules thérapeutiques en cours de développement[42]. Par exemple, des molécules anticancéreuses apparemment actives sur des cultures en 2D se sont révélées inefficaces au cours des essais cliniques[71]. Le manque de prédictivité de ces modèles est d'ailleurs reconnu comme l'une des causes du taux d'échec très élevé des nouveaux médicaments, particulièrement les molécules anticancéreuses dont le taux d'échec avoisine les 90%[42,72].

Ce constat a conduit la communauté scientifique à déployer des efforts considérables pour développer de nouveaux outils précliniques en cancérologie. Le but étant de mettre au point des modèles plus représentatifs de l'environnement des tumeurs *in vivo* et donc mieux prédictifs de leurs réponses aux agents anticancéreux. Le recours à de tels modèles permettrait en effet de réduire les couts et les délais nécessaires au développement des nouveaux médicaments contre le cancer tout en améliorant leur taux de réussite[42,73–75].

Les efforts des chercheurs dans ce domaine ont notamment conduit à l'émergence de nouveaux modèles précliniques basés sur la culture cellulaire en 3D.

C'est ce dont nous allons discuter dans le prochain paragraphe. Nous commencerons par définir globalement la culture cellulaire en 3D et exposer son intérêt dans la modélisation des structures tumorales. Ensuite, nous discuterons certaines des technologies de culture cellulaire en 3D notamment (i) celle des sphéroïdes multicellulaires ; (ii) celle des organoïdes et celle de la bio-impression 3D. Nous décrirons chacune d'entre elles en nous intéressant plus particulièrement à leurs applications pour la modélisation des tumeurs ovariennes.

II.2. La culture cellulaire en 3D

II.2.1. Introduction

Globalement, on peut définir la culture cellulaire en 3D comme étant un ensemble d'approches visant à cultiver des cellules dans un environnement tridimensionnel. Dans un tel environnement, chaque cellule n'aurait pas uniquement des voisines sur le même plan mais également au-dessus et en dessous de sa position.

Cette définition, très générale, englobe un ensemble de méthodes très différentes d'un point de vue technique. Mais la finalité reste la même : passer de la 2D à la 3D donc à des structures plus représentatives du microenvironnement tumoral et des interactions qui s'y déroulent[53].

Cette troisième dimension semble avoir un impact important sur l'organisation et le fonctionnement des cellules cancéreuses. Ceci peut être illustré à travers plusieurs aspects comme suit :

- ✓ Dans les systèmes de culture cellulaires en 3D, la morphologie des cellules est mieux préservée[76]. En plus, la prolifération cellulaire est plus lente et donc plus réaliste qu'en 2D où les cellules prolifèrent de manière anormalement rapide[53]. Or, le rythme de prolifération des cellules a un impact sur leur sensibilité aux agents cytotoxiques ;

- ✓ Les modèles basés sur la culture cellulaire en 3D permettent de mieux simuler les interactions intercellulaires et les interactions (Cellules – ECM) observées *in vivo*[40,76] ;
- ✓ Les techniques de culture cellulaire en 3D permettent également de reproduire les gradients d'oxygène et de nutriments retrouvés dans les tissus tumoraux[40]. Au sein des structures cellulaires en 3D, il est aussi possible d'étudier la diffusion des molécules médicamenteuses ce qui contribue à mieux prédire leurs effets thérapeutiques[77] .

D'un point de vue technique, les approches de culture cellulaire en 3D sont diverses et elles évoluent constamment au gré des innovations des chercheurs. Ceci rend d'ailleurs difficile de les classer de manière précise et exhaustive. Néanmoins, ces approches sont fondamentalement divisées en 2 grands groupes[76] :

- ✓ **Les approches matrice-dépendantes (ou scaffold-based approaches en anglais)**. Les cellules sont incluses dans une matrice qui constitue l'environnement tridimensionnel dans lequel elles vont se développer[78] ;
- ✓ **Les approches matrice-indépendantes (ou scaffold-free approaches en anglais)**. On exploite la capacité des cellules à s'auto-agréger pour constituer des structures tridimensionnelles[78].

Au sein de ces 2 grandes catégories, plusieurs types de modèles cellulaires 3D peuvent être distingués[74]. Ceux-ci incluent les sphéroïdes multicellulaires ; les organoïdes et les modèles bio-imprimés en 3D[74].

II.2.2. Les sphéroïdes multicellulaires et les sphéroïdes tumoraux

Les sphéroïdes multicellulaires (Multicellular Spheroids ou (MCS) en anglais) peuvent être définis comme étant des agrégats cellulaires tridimensionnels de forme globalement sphérique. Dans les sphéroïdes tumoraux multicellulaires (Multicellular Tumor Spheroids ou MCTS en anglais) au moins l'un des types cellulaires présents est cancéreux. Les sphéroïdes représentent le mode de culture cellulaire 3D le plus ancien et le plus largement utilisé encore actuellement. En effet, ils sont relativement simples à obtenir comparativement à d'autres approches de culture cellulaire en 3D.

Les MCS peuvent être formés aussi bien *via* les approches matrice-dépendantes que *via* les approches matrice-indépendantes[79] :

- **Les approches matrice-dépendantes**

Cette stratégie consiste à utiliser des matériaux « supports » pour permettre la formation et la croissance des sphéroïdes dans un environnement 3D[78]. Ces matériaux jouent donc d'abord le rôle d'une charpente ou d'un support physique. En fonctions de leurs propriétés mécaniques et biologiques, ils influencent aussi fortement les caractéristiques morphologiques et fonctionnelles des sphéroïdes obtenus[78]. Il est donc important de sélectionner le type de matrice adéquat en fonction de l'application envisagée.

Généralement, les matériaux utilisés comme matrices sont classés en fonction de leur origine. On distingue ainsi les matrice d'origine naturelle et les matrices d'origine synthétique[78].

Les matrices d'origine naturelle
Les matrices d'origine naturelle utilisées dans la culture de sphéroïdes sont souvent de nature protéique. Il peut s'agir[80] :

- ✓ De protéines issues de la matrice extracellulaire (collagène, laminine, Matrigel®) ;
- ✓ De protéines obtenues par modification de composants de l'ECM (gélatine) ;
- ✓ De protéines plasmatiques (fibrinogène).

Certaines matrices non-protéiques sont aussi utilisées comme l'alginate de sodium ; le chitosan ; l'agarose ou l'acide hyaluronique[81]. Parfois, une combinaison d'une molécule protéique + une molécule non protéique est utilisée. Ceci permet de conjuguer les propriétés biologiques de la protéine et les propriétés mécaniques de la molécule osidique.

Les matrices d'origine naturelle présentent globalement les avantages suivants :

- ✓ Une bonne biocompatibilité[82] ;
- ✓ Les protéines issues de la matrice extracellulaire sont biologiquement actives. Elles permettent de recréer les interactions (cellules – ECM). Ceci favorise l'adhésion et la prolifération cellulaire et permet de mieux simuler les conditions trouvées *in vivo*[83] ;
- ✓ Les molécules issues de la matrice extracellulaire sont dégradables par les enzymes cellulaires. Ceci permet donc de reproduire des phénomènes observés *in vivo* comme le remodelage de la matrice par les cellules cancéreuses[81].

Les matrices d'origine naturelle présentent néanmoins certaines limites[84,85] :

- ✓ Elles offrent des possibilités limitées en termes de flexibilité de design et de propriétés mécaniques ;
- ✓ Certains produits d'origine naturelle présentent une variabilité de composition d'un lot à l'autre. Ceci peut affecter la reproductibilité des résultats expérimentaux.

Les matrices synthétiques

Plusieurs composés synthétiques peuvent être utilisés comme matrices pour la culture des sphéroïdes. On peut citer : les polyéthylène glycols, l'alcool de polyvinyle, le pyrrolidone de polyvinyle etc[86].

Ces matériaux offrent beaucoup de possibilités en termes de design et de propriétés mécaniques. Leur forme et leur rigidité peuvent être précisément ajustées en fonction du but de l'étude. Par contre, les matrices artificielles sont moins favorables à l'adhésion cellulaire par rapport aux matrices naturelles[80].

- ➢ **Les approches matrice-indépendantes**

Ces techniques permettent d'éviter de recourir à des matrices et donc éviter leurs influences sur le développement des sphéroïdes. Dans les approches matrice-indépendantes, on exploite la capacité des cellules à s'auto-assembler pour constituer des structures tridimensionnelles. Plusieurs techniques basées sur ce principe ont été mises au point.

L'approche des plaques à surface antiadhésive (Ultra Low Attachment plates ou Liquid overlay method en anglais)

Le principe de cette méthode est illustré par la Figure 1.5. Des suspensions cellulaires sont ensemencées dans des plaques dont les surfaces ont été traitées pour s'opposer à l'adhésion des cellules. Ces dernières sont alors forcées de s'assembler les unes aux autres pour constituer des sphéroïdes multicellulaires. Ces traitements de surface peuvent être faits soit avec de l'agarose ou avec du poly-2-hydroxyethyl méthacrylate (poly-HEMA)[87].

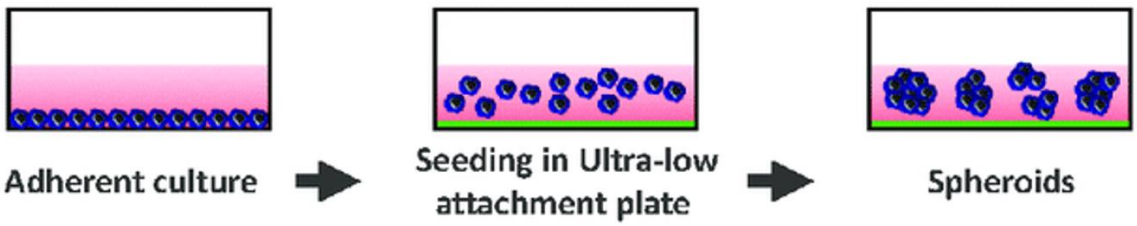


Figure 1.5. Principe de l'approche des plaques à surface antiadhésive[88].

Cette méthode est la méthode matrice-indépendante la plus utilisée pour générer des sphéroïdes[89]. Elle présente en effet de nombreux avantages[87] :

- ✓ Possibilité de moduler la taille des sphéroïdes en ajustant la densité de la suspension cellulaire ;
- ✓ Possibilité de combiner plusieurs types cellulaires pour générer des sphéroïdes hétérotypiques ;
- ✓ Possibilité de générer rapidement un grand nombre de sphéroïdes.

Par contre, la préparation des plaques antiadhésives peut être chronophage. Les plaques antiadhésives disponibles dans le commerce peuvent augmenter significativement le cout des expérimentations[87].

L'approche de la goutte suspendue (the hanging drop method en anglais)
Le principe de cette méthode est illustré par la Figure 1.6. La suspension cellulaire est répartie en petites gouttes de 20 à 50 µL à la surface d'un support. Celui-ci est ensuite retourné. Les gouttes sont maintenues en suspension grâce à la tension superficielle. La gravité entraine les cellules au fond de la goutte (interface air-liquide) et les force à s'agréger pour former un sphéroïde multicellulaire[51]. Ici aussi c'est la densité initiale de la suspension cellulaire qui permet d'ajuster la taille des sphéroïdes obtenus.

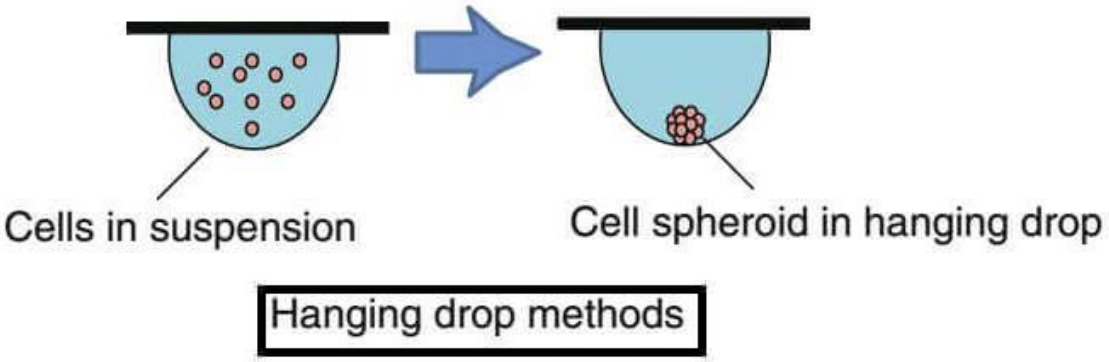


Figure 1.6. Principe de la méthode de la goutte suspendue[90].

Cette technique a pu être adaptée pour générer des sphéroïdes homogènes à partir d'un grand nombre de lignées cellulaires[87]. Cependant, elle ne permet pas de former des sphéroïdes de grande taille, des gouttes de suspension de plus de 50 µL ne pouvant pas être

maintenues en suspension par la tension superficielle[84]. En plus, dans un volume de milieu aussi faible, les cellules sont peu exposées à l'oxygène et aux nutriments[91]. Pour maintenir leur viabilité, les sphéroïdes formés doivent donc être rapidement récoltés et replacés dans du milieu frais. Ceci rend cette technique chronophage et laborieuse à mettre en place ce qui réduit son applicabilité à grande échelle[87].

L'approche par agitation (agitation-based method en anglais)
Dans cette approche, deux types de dispositifs peuvent être utilisés : (i) soit des flacons à agitateur (spinner flasks en anglais) ou des bioréacteurs rotatifs (rotating bioreactors en anglais) (Figure 1.7). Dans les 2 cas, le principe est similaire. Il s'agit d'introduire la suspension cellulaire dans un contenant et de la soumettre à une agitation permanente. Celle-ci maintient les cellules en suspension et empêche leur sédimentation et leur adhésion aux parois. Les cellules vont donc s'assembler les unes aux autres pour constituer des sphéroïdes[87].



Figure 1.7. Les dispositifs utilisés dans l'approche par agitation[92]. A gauche : flacon à agitateur. A droite : bioréacteur rotatif.

Ces équipements sont conçus pour permettre le renouvellement du milieu au cours de la culture. L'agitation continue assure par ailleurs l'élimination des déchets métaboliques accumulés au tour des agrégats cellulaires et leur apporte de nouveaux nutriments. Ceci rend cette méthode compatible avec une culture à long terme[93,94]. En fonction de la taille des flacons, une production à grande échelle est également envisageable[76].

Néanmoins, l'approche par agitation implique une forte consommation de milieu par rapport aux deux méthodes décrites précédemment (plaques antiadhésives et goutte suspendue)[95]. De plus, les sphéroïdes produits sous agitation sont hétérogènes en termes de taille et de nombre de cellules. Il est donc nécessaire de sélectionner manuellement les sphéroïdes de taille similaire avant de les utiliser pour des expériences ultérieures[76].

Enfin, l'agitation soumet les cellules à des forces de cisaillement pouvant affecter leur viabilité[94]. Dans les flacons à agitateur en particulier, ces forces sont relativement importantes et seules des lignées résistantes peuvent y être cultivées[87].

Agrégation sous l'influence de forces physiques

Les 3 méthodes évoquées ci-dessus sont les plus largement utilisées pour générer des sphéroïdes sans recourir à l'usage d'une matrice. Cependant, d'autres approches sont décrites dans la littérature. Elles consistent à utiliser divers phénomènes physiques (magnétisme, ultra-sons). Nous les décrivons brièvement ci-dessous.

- La lévitation magnétique

Dans cette approche, les cellules sont d'abord incubées en présence de nanoparticules magnétiques. Après absorption des nanoparticules, les cellules sont mises en culture en présence d'un champ magnétique adéquat. Le but étant de les empêcher d'adhérer au support de culture et de les maintenir en lévitation. Elles adhèrent alors les unes aux autres pour former des sphéroïdes[96]. Dans cette approche, l'inconvénient majeur est le recours à des nanoparticules, leur impact sur le fonctionnement cellulaire n'étant pas parfaitement compris[58].

- L'usage d'ondes acoustiques

Ici, des ondes ultrasons sont utilisées pour guider les cellules au sein d'une suspension et les concentrer à un point donné. Ceci permet de les forcer à s'agréger pour former des sphéroïdes. Dans cette approche, la taille des sphéroïdes peut être contrôlée en ajustant les paramètres des ondes sonores utilisées. Il faut cependant prendre en considération l'impact sur le cytosquelette que peuvent avoir ces ondes[58].

Ainsi les méthodes basées sur des phénomènes physiques requièrent l'usage d'équipements spécifiques. De plus, elles font intervenir des réactifs et/ou des forces pouvant compromettre la viabilité cellulaire. Ces méthodes ne sont donc pas les plus adaptées pour concevoir des modèles destinés à l'évaluation d'agents thérapeutiques[58].

Nous allons maintenant étudier l'application de la technologie des sphéroïdes à la modélisation du cancer ovarien.

- **Application de la technologie des sphéroïdes à l'étude du cancer ovarien**

Si nous avons parlé des sphéroïdes comme d'un mode de culture cellulaire en 3D *in vitro*, il faut savoir qu'ont peut également les retrouver *in vivo*. **Ils jouent notamment un rôle clé dans la physiopathologie du cancer ovarien**. A partir d'une tumeur ovarienne primaire, des sphéroïdes cancéreux peuvent en effet se détacher et se répandre dans l'ascite. ils peuvent ensuite s'implanter sur d'autres structures abdominales pour constituer des tumeurs secondaires[97]. Ce mode de dissémination explique le potentiel métastatique important du cancer ovarien et le mauvais pronostic qui lui est associé[97].

Pour cette raison, la technologie des sphéroïdes revêt un intérêt particulier dans l'exploration de la physiopathologie des cancers ovariens. Ainsi, les chercheurs l'ont utilisée dans divers travaux. Des exemples d'application sont présentés dans le Tableau 1.2.

Tableau 1.2. Exemples d'applications des sphéroïdes à la recherche sur les cancers ovariens.

Champs d'application	**Réf(s).**
Etude des processus métastatiques du cancer ovarien (mécanismes moléculaires ; rôle des éléments du TME ; identification de cibles thérapeutiques potentielles).	98–103
Etude des cellules souches cancéreuses (origine ; caractéristiques moléculaires ; rôle dans la chimiorésistance).	104–107
Etude des phénomènes de chimiorésistance (bases moléculaires ; facteurs favorisants ; cibles thérapeutiques potentielles).	108–110
Etablissement de la relation entre la taille des sphéroïdes, leur chimiorésistance et leur profil migratoire.	111
Etude de l'impact de certaines cytokines pro-inflammatoires sur la prolifération des cellules cancéreuses ovariennes.	112

Le Tableau 1.2 illustre la diversité des aspects pouvant faire appel aux sphéroïdes dans l'étude du cancer ovarien. Cette technologie a également été mise à profit pour créer des modèles destinés à l'évaluation d'outils thérapeutiques. Nous proposons une analyse des exemples les plus récents (2020 – 2023) dans le Tableau 1.3 .

Tableau 1.3. Exemples de modèles du cancer ovarien utilisant des sphéroïdes pour l'évaluations d'outils thérapeutiques.

Réf. / Année	Explications et but global de la publication	Stratégie d'obtention des sphéroïdes et types cellulaires composant le modèle	Principaux résultats obtenus et limites du modèle proposé
[113] / 2020	Des sphéroïdes ont été générés pour évaluer l'activité cytotoxiques du paclitaxel et la comparer avec des cultures cellulaires en 2D.	- Deux méthodes de type scafflod-free : l'usage de plaques antiadhésives et la goutte suspendue. - Deux lignées cancéreuses ovariennes : SKOV-3 et OVCAR-3 (Un type cellulaire par modèle = monocultures).	Les sphéroïdes obtenus ont montré une croissance ralentie et une plus grande résistance au Paclitaxel par rapport aux cellules cultivées en 2D. Les limites suivantes sont à noter : - Absence d'éléments du TME ; - Contraintes pour contrôler la forme des sphéroïdes (nécessité d'ajouter de la méthylcellulose dans le milieu de culture pour avoir une forme arrondie et régulière) ; - Nécessité d'attendre au moins 24 heures pour avoir la formation des sphéroïdes.
[114] / 2021	Le modèle cité dans l'exemple précédent ([113]) a été amélioré par la même équipe de recherche. Des sphéroïdes **en coculture** ont été établis et caractérisés. Ce modèle a ensuite été utilisé pour évaluer l'activité cytotoxique du paclitaxel en comparaison avec	- Usage de plaques antiadhésives pour la culture des sphéroïdes - Des cellules cancéreuses ovariennes SKOV-3 ont été mises en coculture soit avec des MUC-9 (cellules mésenchymateuses) ou avec des CCD27-Sk (fibroblastes).	Ici, un élément du TME est représenté à travers les cellules mésenchymateuses ou les fibroblastes. Aucune différence n'a été observée entre les sphéroïdes en monoculture et ceux en coculture en termes de réponses au paclitaxel. Cependant, une régulation positive de certains gènes liés à la tumorigenèse, à l'angiogenèse et au processus métastatiques a été observée en coculture. On retrouve certaines limites décrites dans l'exemple précédent :

	des cultures en 2D et des sphéroïdes en monoculture.		- Nécessité d'utiliser de la méthylcellulose pour mieux contrôler la forme des sphéroïdes ; - Le délai nécessaire à la formation des sphéroïdes (24 heures) ; - La courte durée de culture des sphéroïdes (mise en culture pendant 48 heures puis exposition au Paclitaxel pendant 48 heures). Selon les auteurs, la courte durée d'exposition explique en partie l'absence de différences entre les monocultures et les cocultures en termes de réponses au paclitaxel.
[115] / 2021	Un modèle à base de sphéroïdes a été utilisé pour évaluer l'efficacité d'une combinaison thérapeutique (cisplatine + inhibiteur de la A désintégrine et métalloprotéase 17 (A disintegrin and metalloprotease 17 ou (ADAM 17) en anglais).	- Sphéroïdes générés par l'usage de plaques antiadhésives - Des lignées cancéreuses ovariennes (HEY, Igrov-1, SKOV-3, OVCAR-8 et A2780) et des cellules cancéreuses primaires ovariennes ont été utilisées (modèles en monoculture à chaque fois).	Dans cette étude, la technologie des sphéroïdes a été utilisée en complément de la culture 2D pour évaluer une combinaison thérapeutique. Certaines limites peuvent être signalées : - Les éléments du TME ne sont pas pris en compte dans les sphéroïdes utilisés dans cette étude ; - Les caractéristiques des sphéroïdes obtenus dépendent du type cellulaire (agrégats plus ou moins compacts). Certains types cellulaires, n'ayant pas pu former de sphéroïdes suffisamment durables, n'ont pas pu être testés en 3D ; - Il a été nécessaire d'évaluer systématiquement le diamètre des sphéroïdes avant de les exposer aux agents thérapeutiques.
[116] / 2021	Dans cette étude, les auteurs mentionnent explicitement que	- Sphéroïdes obtenus *via* l'approche de la goutte suspendue.	Ce modèle reprend des aspects clés du TME (fibroblastes, molécules

	leur modèle vise à simuler une tumeur **épithéliale** ovarienne. Un modèle basé sur des sphéroïdes a été développé pour étudier la diffusion de nanovecteurs dans les (i) les agrégats en suspension dans l'ascite et (ii) les tumeurs ovariennes métastatiques.	Une partie des sphéroïdes a ensuite été incluse dans une matrice peptidique mimant l'ECM. - Deux types cellulaires ont été combinés au sein des sphéroïdes (coculture) : (i) des SKOV-3 et des MRC-5 (fibroblastes).	mimant l'ECM). On peut cependant souligner les limites suivantes - Les conditions dynamiques associées notamment aux mouvements de l'ascite ne sont pas prises en compte ; - Le modèle de métastase est très simplifié car il ne prend pas en compte les populations cellulaires saines (tissus sains) présentes dans le site métastatique - Le délai nécessaire à la formation des sphéroïdes (24 heures).

L'analyse globale des Tableau 1.2 et Tableau 1.3 nous permet de constater que la technologie des sphéroïdes commence à prendre sa place dans la recherche sur le cancer ovarien. La force majeure de cette technologie reste sa relative simplicité notamment *via* l'usage des plaques antiadhésives. En effet, hors-mi ces plaques, cette approche ne nécessite aucun équipement ou entrainement spécifique. Elle est donc rapidement accessible aux équipes de recherche qui souhaitent disposer d'un modèle cellulaire 3D.

Néanmoins, les chercheurs se heurtent encore très souvent aux limites inhérentes à la technologie des sphéroïdes. Nous pouvons résumer ces limites à travers les quelques points suivants :

- ✓ Lors de l'usage de l'approche scaffold-free, la possibilité d'obtenir des sphéroïdes dépend largement de la capacité d'agrégation des cellules utilisées[113]. Donc, tous les types cellulaires ne sont pas capables de générer des sphéroïdes. Les caractéristiques des cellules utilisées déterminent également la morphologie et le caractère plus ou moins compact des sphéroïdes obtenus. Le problème devient plus complexe lorsqu'il est question de créer des sphéroïdes hétérotypiques comportant plusieurs types

cellulaires différents avec des capacités d'agrégation différentes. Or, l'association de plusieurs types cellulaires est justement indispensable à la création d'un modèle simulant l'hétérogénéité tumorale ;

- ✓ Les cellules ayant un grand potentiel métastatique ont souvent **une faible capacité à former des sphéroïdes**[6]. Ceci s'explique par leur faible expression des molécules d'adhésion[6]. Or ces cellules sont très importantes à étudier en raison de l'importance des phénomènes métastatiques dans la physiopathologie cancéreuse ;
- ✓ La technologie des sphéroïdes pause un problème de reproductibilité par rapport à la taille et à la forme des structures obtenues. Cette question a d'ailleurs été pointée et discutée par des revues bibliographiques récentes[79]. En effet, la taille des sphéroïdes a un impact important sur leurs réponses aux molécules médicamenteuses. Pour résoudre ce problème, certaines stratégies peuvent être mises en place comme (i) Le recours à des outils supplémentaires pour mieux contrôler la forme des sphéroïdes (Ex. L'addition de méthylcellulose dans le milieu de culture[113,114]) ou (ii) Le tri des sphéroïdes avant de les exposer à des agents thérapeutiques. Ces stratégies induisent donc des contraintes techniques et des délais supplémentaires ;
- ✓ La formation des sphéroïdes implique un temps d'attente qui varie de quelques heures à quelques jours en fonction du type cellulaire considéré ;
- ✓ La technologie des sphéroïdes n'offre pas la possibilité de contrôler l'architecture des structures obtenues. Plus précisément, il est difficile de contrôler la position de chaque type cellulaire en cas de coculture par exemple.

On peut également constater que les modèles à base de sphéroïdes proposés à l'heure actuelle manquent encore largement d'hétérogénéité cellulaire comparativement aux tumeurs ovariennes retrouvées *in vivo*. Pour essayer d'atteindre un niveau supérieur de complexité biologique, d'autres équipes de recherche ont opté pour une technologie de culture cellulaire en 3D d'apparition plus récente : celle **des organoïdes**.

C'est cette technologie que nous allons aborder dans le prochain paragraphe. Nous proposerons d'abord un ensemble de définitions. Ensuite, nous aborderons plus en détail les organoïdes cancéreux et nous évoquerons leurs applications aux cancers ovariens.

II.2.3. Les organoïdes

- **Introduction / définition**

Les organoïdes sont généralement définis comme étant des structures cellulaires tridimensionnelles auto-assemblées, obtenues *in vitro* à partir de **cellules souches ou de cellules primaires**. Ces cellules prolifèrent et s'organisent au sein d'une **matrice tridimensionnelle** pour reproduire *in vitro* les **caractéristiques structurales et fonctionnelles fondamentales** du tissu ou de l'organe à simuler grâce à l'usage de cocktails spécifiques de facteurs de croissance[79,117,118].

Cette définition nous permet de retenir certains éléments clés qui distinguent la technologie des organoïdes de celle des sphéroïdes. On peut résumer cela de la manière suivante :

1. L'origine des cellules : Les organoïdes sont développés à partir de cellules souches ou de cellules primaires. A l'inverse, la définition générale des sphéroïdes n'inclue pas de spécifications par rapport à l'origine des cellules ;

2. Les organoïdes sont généralement obtenus en utilisant une matrice. Donc *via* une approche scafflod-based. Très souvent, c'est la matrice portant le nom commercial Matrigel® qui est utilisée pour le développement des organoïdes[119] ;

3. Au-delà de leur architecture tridimensionnelle, les organoïdes sont décrits comme ayant la capacité de reproduire des aspects structuraux et fonctionnels des organes ou tissus qu'ils représentent. Par exemple, des organoïdes intestinaux vont reproduire la structure et la polarisation de l'épithélium intestinal[120]. De la même manière, des organoïdes hépatiques vont avoir une activité enzymatique de type cytochrome P450 et une capacité de sécrétion de l'albumine[121] (propriétés analogues à celles du tissu hépatique *in vivo*).

Ce troisième critère de la définition peut s'appliquer aux organoïdes reproduisant des tissus sains. En revanche, il est beaucoup plus difficile à appliquer aux organoïdes simulant des structures tumorales. En effet, les tissus cancéreux sont des tissus anormaux qui ne sont pas caractérisés par une fonction spécifique. Leur architecture quant à elle est très variable en fonction du type cancéreux et en fonction des patients. En un mot : un cancer n'est pas un organe. Donc même si le terme « organoïde » est souvent utilisé pour désigner des modèles tumoraux *in vitro*, la définition précise d'un organoïde cancéreux reste difficile à établir.

Dans ce manuscrit, nous désignons comme « organoïdes cancéreux » les modèles décrits comme tels dans la littérature.

- **Les méthodes d'obtention des organoïdes cancéreux**

Les organoïdes cancéreux décrits dans la littérature sont généralement obtenus *via* deux approches différentes[122] :

A partir d'organoïdes sains
Dans cette approche, des organoïdes sains sont d'abord générés à partir de cellules souches. Ensuite, ces organoïdes sont soumis à des manipulations génétiques permettant de générer des mutations cancérogènes.

A partir de cellules cancéreuses de patients
Il s'agit de l'approche la plus utilisée pour générer des organoïdes cancéreux[122]. Ceux-ci sont alors décrits comme étant des structures 3D auto-assemblées obtenues à partir de cellules cancéreuses primaires et reproduisant *in vitro* les aspects histologiques, phénotypiques et génétiques clés de la tumeur originale[123].

Les méthodes visant à générer des organoïdes tumoraux à partir de cellules cancéreuses primaires peuvent varier en fonction : (i) de la provenance de ces cellules (biopsies, pièces d'exérèse chirurgicale…) et (ii) du groupe de travail à l'origine de l'approche.

Néanmoins, ces méthodes ont en commun **certaines étapes clés** qui peuvent être résumés de la manière suivante[124] :

1. Les cellules cancéreuses sont d'abord extraites à partir de l'échantillon du patient : Dans le cas d'une tumeur solide (prélèvement par biopsie ou exérèse chirurgicale), la pièce est d'abord coupée en morceaux d'environ 1 à 3 mm^3. On procède ensuite à une digestion enzymatique. Celle-ci permet d'éliminer la matrice extracellulaire et de récupérer des cellules cancéreuses isolées ou des petits agrégats cellulaires ;

2. Les cellules cancéreuses récupérées sont mises en culture dans une matrice (telle que le Matrigel®). Cette matrice va servir de support au développement tridimensionnel de l'organoïde cancéreux. Elle apportera aussi des facteurs de croissance favorisant son développement ;

3. Les préparations ainsi obtenues sont mises en culture dans un milieu contenant un cocktail de facteurs de croissance. C'est un cocktail qui a été initialement utilisé **pour générer des organoïdes épithéliaux sains à partir de cellules souches adultes** (Adult Stem Cells ou ASCs en anglais). Son utilisation a ensuite été étendue à la génération d'organoïdes tumoraux à partir de cellules cancéreuses primaires[122,124]. Cette précision historique est importante pour comprendre la composition de ce cocktail de facteurs de croissance. Celui-ci comprend généralement les éléments suivants[122,124,125] (Tableau 1.4).

Tableau 1.4. Principaux facteurs de croissance utilisés dans la culture des organoïdes cancéreux à partir de cellules primaires.

Facteur de croissance utilisé	**Rôle / Importance**
R-Spondine-1	C'est un ligand du récepteur LRG5 (de l'anglais Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 5) et activateur de la voie de signalisation Wnt[124]. Le LRG5 est un récepteur exprimé par les cellules souches adultes[126]. Son activation par la R-Spondine-1 stimule leur prolifération[127].
EGF (de l'anglais Epidermal Growth Factor)	Utilisé pour sa capacité à favoriser la prolifération des cellules épithéliales.
Noggine	C'est un inhibiteur de la BMP (de l'anglais Bone Morphogenetic Protein). En effet, l'inhibition de la BMP permet de moduler la différenciation des cellules épithéliales[125]. En dehors de la Noggine, d'autres inhibiteurs de la BMP peuvent être utilisés.

Ces approches de génération d'organoïdes cancéreux ont été mises à profit pour la recherche contre le cancer ovarien. Nous traitons cela dans le titre suivant.

- **Application de la technologie des organoïdes au cancer ovarien**

La plus-value majeure des organoïdes cancéreux ovariens est certainement **leur capacité à reproduire *ex-vivo* des caractéristiques phénotypiques et génotypiques clés des tumeurs dont ils sont issus**[128,129]. A partir de là, les organoïdes sont devenus un outil intéressant pour la médecine dite « personnalisée ». En effet, ils permettent notamment d'anticiper la réponse

thérapeutique de la patiente et d'ajuster sa prise en charge en conséquence. Par ailleurs, ils sont également utilisés pour évaluer l'efficacité de nouvelles approches thérapeutiques. La technologie des organoïdes trouve enfin des applications dans les études visant à comprendre l'origine ou les mécanismes de dissémination des cancers ovariens.

Dans le Tableau 1.5 ci-dessous, nous proposerons une synthèse décrivant les champs d'applications majeurs des organoïdes cancéreux ovariens. Ensuite dans le Tableau 1.6, nous discuterons plus en détail les travaux utilisant les organoïdes pour étudier les réponses à différentes approches thérapeutiques. Nous y mentionnerons des exemples représentant les différentes variantes de cette technologie (durées de développement et de culture plus ou moins longues ; différentes sources de cellules ; évaluation de molécules commercialisées ou de nouveaux outils etc.).

Tableau 1.5. Exemples d'applications des organoïdes cancéreux ovariens.

Champs d'applications	**Réf(s).**
Usage d'organoïdes tumoraux ovariens dérivés de patientes dans le but de reproduire *ex-vivo* l'hétérogénéité cancéreuse. Ces organoïdes sont notamment utilisés pour étudier ou prédire la réponse tumorale à différentes approches thérapeutiques (agents cytotoxiques, nouvelles approches basées sur des micro-ARNs…).	128,130–136
Usage d'organoïdes dérivés de patientes pour étudier les caractéristiques génétiques des cancers ovariens et identifier leurs potentielles implications thérapeutiques notamment la sensibilité ou la résistance aux traitements.	137–139
Usage d'organoïdes dérivés de patientes pour explorer les mécanismes moléculaires impliqués dans la chimiorésistance et identifier d'éventuelles cibles thérapeutiques.	140–142
Usage d'organoïdes murins ou humains dérivés de cellules souches pluripotentes induites pour investiguer l'origine histologique et les phases initiales de développement des lésions cancéreuses ovariennes.	143,144
Usage d'organoïdes dérivés de patientes pour comprendre certains mécanismes de la dissémination péritonéale du cancer ovarien. Plus particulièrement, cette étude visait à étudier la relation entre la polarisation baso-apicale des cellules cancéreuses et leur potentiel de dissémination métastatique. Des modèles *in vitro* et *in vivo* ont été utilisés dont des organoïde.	145

Tableau 1.6. Exemples de l'application des organoïdes cancéreux ovariens à l'évaluation d'outils thérapeutiques.

Réf. / Année	Description de l'étude / Objectif global	Approche permettant l'obtention des organoïdes cancéreux	Conclusions de l'étude / Discussion et limites
[133] / 2020	Des organoïdes ont été générés à partir de plusieurs types de tumeurs ovariennes (dont des tumeurs épithéliales, notamment HGSC). Ils ont été caractérisés sur les plans histologique ; immunologique et génétique. Ils ont ensuite été soumis à plusieurs traitements antitumoraux. Les résultats ont été comparés à ceux des tumeurs primaires dont les organoïdes sont issus.	Les organoïdes ont été générés à partir de prélèvements issus de biopsies (échantillons solides). Le Matrigel® a été utilisé comme matrice 3D pour la culture des organoïdes. Pour ce qui est du milieu, les auteurs ont d'abord utilisé un milieu de culture décrit dans la bibliographie[146,147] dont la composition est analogue à celle évoquée dans le Tableau 1.4. Mais face à un Taux de Réussite des Culture d'Organoïdes (TRCO) relativement faible (33%), ils ont entrepris une phase d'optimisation. Ils ont testé plusieurs milieux de compositions différentes. Ceci leur a permis d'atteindre un TRCO maximal de 56%.	Les auteurs ont souligné la capacité des organoïdes à reproduire des caractéristiques des tumeurs primaires (marqueurs immunologiques, profil de mutations génétiques). Les réponses des organoïdes aux agents thérapeutiques étaient patientes-dépendantes reproduisant le profil de chimio-sensibilité des tumeurs primaires. Les limites suivantes peuvent néanmoins être soulignées : - La composition des milieux de culture utilisés était complexe avec de nombreux facteurs de croissance. Ceci implique des couts élevés ; - Même après une phase d'optimisation complexe, le TRCO maximal obtenu était de 56%. Ceci témoigne de la difficulté de développer des organoïdes à partir de cellules cancéreuses primaires ; - La développement des organoïdes à partir des cellules tumorales isolées a pris 2 à 4 semaines.

[136]/ 2020	Cette étude met en avant la possibilité de générer des organoïdes cancéreux **rapidement** afin les utiliser comme modèles pour l'évaluation de stratégies thérapeutiques. Les organoïdes obtenus ont été soumis à des caractérisations histologiques et génétiques. Cette étude s'intéresse spécifiquement au HGSC (qui est un type de tumeurs épithéliales).	Pour générer les organoïdes, les auteurs ont utilisé des **sphéroïdes cancéreux** issus de fluides pathologiques (ascites ou épanchements pleuraux). Un extrait de membrane basale (BME pour Basement Membrane Extract en anglais) a été utilisé comme matrice pour la culture des organoïdes. Le milieu utilisé comprend les acteurs clés de la culture des organoïdes (Tableau 1.4).	Cette approche exploite une source de cellules primaires (ascites ou épanchements pleuraux) qui est **souvent abondante** chez les patientes atteintes de HGSC. Par ailleurs, les organoïdes ont été utilisés 3 jours après leur mise en culture pour évaluer l'activité d'agents thérapeutique (une durée de 2 à 4 semaines de développement a été appliquée dans l'exemple précédent). Le développement de ces organoïdes a été suivi jusqu'au 6ème jour après la mise en culture. Donc ici, les 2 avantages majeurs sont la disponibilité rapide des organoïdes et l'accessibilité du prélèvement source. Les auteurs ont également décrit une corrélation globale entre la réponse des organoïdes aux agents cytotoxiques et les données cliniques des patientes correspondantes. L'approche décrite dans cette étude présente néanmoins certaines limites : - Dans certains échantillons d'épanchements, la quantité de cellule n'était pas suffisante pour lancer la culture d'organoïdes ; - Les fluides prélevés devaient être traités pour homogénéiser la taille des sphéroïdes cellulaires recueillis. Or ce tri peut exclure certaines sous-

			populations de cellules cancéreuses ou d'autres acteurs du TME ; - Cette étude ne propose pas de comparaisons phénotypiques ou génotypiques entre les organoïdes obtenus et les tumeurs primaires associées.
[134] / 2021	Des organoïdes cancéreux (de l'ovaire et de l'endomètre) ont été utilisés comme outils *ex-vivo* pour prédire rapidement les réponses thérapeutiques des patientes dans une approche de médecine personnalisée. Plusieurs types tumoraux ont été pris en considération dans cette étude dont des tumeurs épithéliales.	Deux types d'échantillons sources ont été utilisés : des pièces d'exérèse chirurgicale et des fluides pathologiques (ascites). Le Matrigel® a été utilisé comme matrice. La mise en culture a été faite avec un milieu comprenant les acteurs clés de la culture des organoïdes décrits dans le Tableau 1.4.	Ici aussi les auteurs ont mis en avant la rapidité de leur approche. Les organoïdes ont en effet été utilisés pour l'évaluation d'agents thérapeutiques dans les 4 jours suivant la mise en culture des cellules primaires. Le TRCO a par ailleurs atteint 83% sur 52 échantillons primaires testés. Dans cette étude, on peut souligner les limites suivantes : - Un seul cas a été cité dans la partie « preuve de concept » pour illustrer la capacité des organoïdes à prédire la réponse thérapeutique obtenue *in vivo*. Or 19 organoïdes de patientes différentes ont été testés ; - L'étude ne propose pas une comparaison phénotypique ou génétique entre les tumeurs primaires et les organoïdes obtenus. Les auteurs le justifient par la rareté du matériel biologique disponible. Les organoïdes générés ont été prioritairement utilisés pour le screening de molécules thérapeutiques. En effet, la rareté du matériel biologique est

			une limite inhérente à l'approche des organoïdes ; - La croissance des organoïdes après cryopréservation dans l'azote liquide a été fortement ralentie. Ceci rend peu envisageable la possibilité d'une conservation en vue d'un usage à long terme ; - Le manque d'éléments du TME et notamment **de structures vasculaires**. **Cette limite est commune aux 3 exemples cités jusqu'à présent mais elle prend tout son sens dans cette étude**. En effet, les organoïdes ici ont été utilisés pour évaluer un agent anti-angiogénique (le bévacizumab). Or l'action antinéoplasique de celui-ci ne peut s'exprimer pleinement en l'absence d'acteurs vasculaires.
[131] / 2021	Des organoïdes cancéreux ovariens ont été utilisés **pour prédire la résistance au carboplatine** (molécule très utilisée en première ligne pour la prise en charge des cancers ovariens). Des caractérisations génétiques ont également été appliquées pour	Les organoïdes ont été générés à partir de pièces d'exérèse chirurgicale (chirurgie cytoréductrice). Le Matrigel® a été utilisé comme matrice pour leur développement. Le milieu utilisé comprend les acteurs clés de la culture des organoïdes (Tableau 1.4).	Tous les organoïdes établis ont pu être validés à travers des similitudes histologiques avec les tumeurs primaires correspondantes (Exemples sur la Figure 1.8). Les auteurs ont par ailleurs rapporté, pour une patiente, une corrélation entre les réponses des organoïdes au carboplatine et la progression clinique. Cette patiente a généré des organoïdes résistants au carboplatine. Elle a aussi récidivé plus rapidement que les autres participantes à l'issus de son traitement.

	identifier une « signature génétique » associée à la résistance au carboplatine. Pour être validés, les organoïdes ont été comparés avec les tumeurs primaires sur le plan histologique. Cette étude s'intéresse exclusivement à des tumeurs ovariennes épithéliales.		Il convient néanmoins de souligner les limites suivantes : - L'étude n'a été menée que sur 6 patientes (effectif très restreint). Ceci peut s'expliquer par le coût et les contraintes techniques associés à la génération des organoïdes. Par ailleurs, les auteurs ont justifié cela pour leur volonté d'avoir une population aussi homogène que possible ce qui a réduit le nombre de personnes éligibles à l'étude ; - La corrélation (réponse des organoïdes – devenir clinique des patientes) ne semble pas se vérifier sur toutes les participantes. Associée au faible effectif général de l'étude, cette observation rend difficile de tirer des conclusions par rapport à la prédictivité des organoïdes décrits ici.

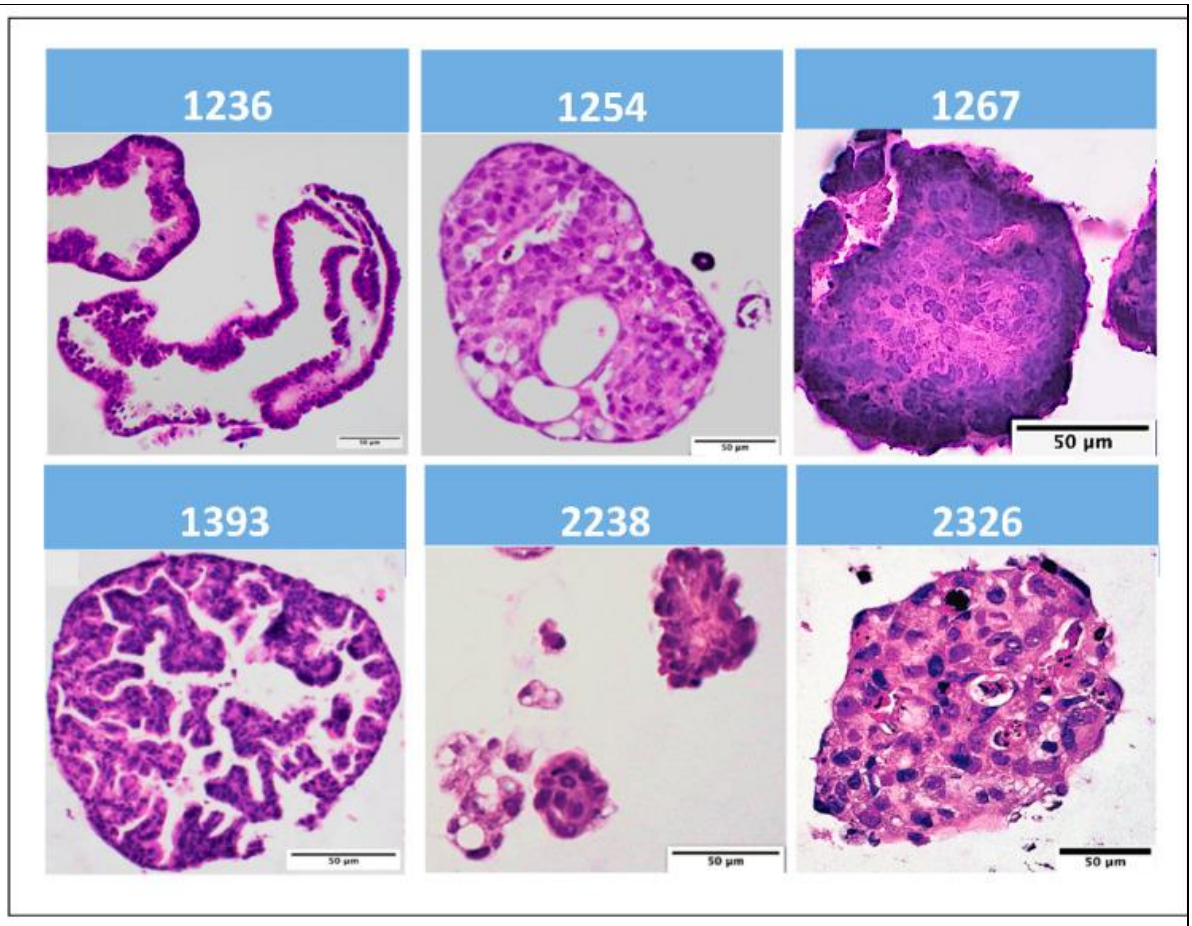


Figure 1.8. Analyse histologique des organoïdes cancéreux ovariens générés dans l'étude de Gorski et al[131]. Sur l'échantillon 1393, on peut observer une architecture labyrinthique avec des formes papillaires. Ces caractéristiques sont très évocatrices du HGSC.

[135] / 2021	Dans cette étude, des organoïdes (à côté de lignées cellulaires en 2D) ont été utilisés pour évaluer une nouvelle approche thérapeutique. Celle-ci se basait sur la reproduction de l'effet cytotoxique d'un microARN dont l'équipe a	Les organoïdes ont été générés à partir d'échantillons tumoraux solides. Le Matrigel® a été utilisé comme matrice pour leur culture. Le milieu utilisé comprend les acteurs clés de la culture des organoïdes (Tableau 1.4).	Dans cet exemple, les organoïdes ne constituent pas « le but » de l'étude. Ils sont véritablement utilisés comme modèle (parmi d'autres) dans l'évaluation d'une nouvelle approche thérapeutique. Ceci atteste que la technologie des organoïdes commence à s'intégrer dans l'arsenal expérimental des chercheurs. Néanmoins dans cette optique, l'équipe n'a pas proposé une « validation » phénotypique ou génétique des organoïdes par

	investigué le mode d'action. Cette étude s'intéresse au carcinome séreux qui est un type de tumeurs épithéliales.		rapport aux tumeurs primaires. Ceci peut s'expliquer par la complexité de l'étude telle qu'elle est décrite et la difficulté supplémentaire qu'une validation des organoïdes aurait impliquée. Par ailleurs, seuls 4 groupes d'organoïdes (4 patientes) ont été utilisés. Les auteurs ne le discutent pas mais cela peut s'expliquer par la difficulté de recruter des patientes éligibles et/ou par le coût et les contraintes techniques associées à la culture des organoïdes.

- **Discussion générale par rapport à la technologie des organoïdes**

La technologie des organoïdes commence à se faire une place dans le cadre de la recherche contre le cancer ovarien. Ceci vaut aussi bien pour des aspects fondamentaux que pour des aspects appliqués. Comparés aux sphéroïdes, les organoïdes permettent d'atteindre un plus haut niveau de complexité biologique. Par exemple, la polarité apico-basale caractérisant certains tissus cancéreux est retrouvée sur des organoïdes mais est impossible à reproduire sur des sphéroïdes[145]. Les organoïdes ouvrent par ailleurs des perspectives très intéressantes notamment en médecine personnalisée (également appelée médecine de précision). Il se peut même que cette technologie devienne à l'avenir un outil d'aide à la prise de décision thérapeutique en pratique médicale courante. Mais avant d'en arriver là, un certain nombre de défis restent à relever.

L'analyse des exemples cités dans le Tableau 1.6 permet en effet d'identifier certaines limites associées à la technologie des organoïdes. Nous pouvons les résumer à travers les points suivants :

Les limites d'ordre technique

Comme nous l'avons vu plus haut, les organoïdes cancéreux sont très souvent dérivés de matériel biologique de patients. Or, l'accès même à cette « matière première » peut être

complexe. Il faut d'abord considérer les procédures administratives visant à obtenir le consentement des patients et à assurer la conformité éthique des études. Par ailleurs, le matériel obtenu peut être de quantité ou de qualité insuffisante pour permettre une culture d'organoïdes. Par exemple, les pièces de biopsie peuvent être de petite taille et ne permettant donc pas de récolter suffisamment de cellules cancéreuses. Il faut aussi considérer le délai entre l'obtention du prélèvement et la mise en culture. Ce délai peut en effet influencer le taux de réussite de culture des organoïdes[134].

L'isolement des cellules cancéreuses à partir des échantillons de patients nécessite également plusieurs étapes de prétraitement. Celles-ci peuvent être plus ou moins complexes en fonction de l'échantillon considéré (digestion enzymatique dans le cas d'échantillons solides ; centrifugation puis filtration et tri des cellules dans le cas d'échantillons liquides). Ces procédés requièrent souvent des réactifs et des compétences spécifiques.

Il convient enfin de souligner que ces contraintes techniques peuvent se répercuter sur la qualité des études publiées. Souvent, le nombre de patients recrutés et le nombre d'organoïdes développés sont si faibles qu'ils réduisent fortement le poids statistique de l'étude.

Le coût

Au-delà des étapes de prétraitement, la culture des organoïdes requière des milieux de composition complexe. Plusieurs facteurs de croissance sont notamment nécessaires. Or, ceux-ci sont relativement couteux (plusieurs centaines d'euros pour les conditionnements les plus petits). A titre de comparaison, la bouteille de milieu de culture usuel DMEM de 500 mL ne coute que 30 € environ. La culture des organoïdes s'avère donc onéreuse surtout si elle est effectuée sur le long terme.

Les variations et les problèmes de reproductibilité

- Le taux de réussite de culture des organoïdes (TRCO)

Comme on peut le voir à travers les exemples du Tableau 1.6, le TRCO varie fortement en fonction de l'étude. Sur une même étude, le TRCO varie aussi en fonction du protocole appliqué et surtout en fonction de l'échantillon initial utilisé. Selon une revue publiée en 2022 et comparant 10 travaux différents[148], le TRCO pour les organoïdes cancéreux épithéliaux ovariens varie entre 29% et 90%[148]. Or avec une telle variation, il est difficile d'envisager

l'application à grande échelle de la technologie des organoïdes notamment en pratique médicale courante.

❖ L'importance de l'échantillon initial

En plus d'influencer le TRCO, l'échantillon initial (source des cellules cancéreuses) influence aussi fortement les propriétés biologiques et les réponses des organoïdes obtenus. On peut s'attendre à ce que des échantillons de patients différents génèrent des organoïdes différents. Il s'agit de **l'hétérogénéité inter-tumorale**. Mais il faut aussi mentionner que deux échantillons prélevés à deux endroits différents dans une même tumeur peuvent générer des organoïdes différents. On parle alors d'hétérogénéité **intra-tumorale**[149]. Les sources de variations associées à l'échantillon sont donc nombreuses et doivent être bien connues et prises en compte au moment de l'interprétation des résultats.

❖ L'impact des réactifs utilisés dans la culture des organoïdes

Comme on peut le voir à travers les exemples du Tableau 1.6, le Matrigel® en particulier est un réactif très utilisé pour la culture des organoïdes. Ce produit est une matrice extraite à partir de la membrane basale d'un sarcome murine appelé la tumeur de Engelbreth-Holm-Swarm[119]. La composition du Matrigel® comprend notamment des protéines clés de la matrice extracellulaire telles que la laminine (environ 60%) et le collagène IV (environ 30%)[150]. Ces protéines favorisent l'adhésion de plusieurs types cellulaires tels que les cellules souches, les cellules épithéliales et les cellules cancéreuses. La laminine contenue dans le Matrigel® favorise également la différentiation cellulaire et la croissance tumorale[150]. Ceci explique probablement en partie le fait que le Matrigel® donne de très bons résultats dans la culture des organoïdes.

Or ce réactif présente aussi des limites. En effet, la composition globale du Matrigel® est très complexe et encore mal définie. Elle peut en plus être sujette à des variations inter-lots. Ceci peut affecter la fiabilité et la reproductibilité des résultats expérimentaux[150]. Consciente de ces limites, la communauté scientifique s'efforce à trouver des alternatives à ce matériau. Parmi les possibilités les plus prometteuses dans ce sens, on peut citer : les hydrogels à base d'extraits de matrice extracellulaire ; les protéines extraites de sources naturelles (notamment le collagène) ; les protéines recombinantes ; les polymères synthétiques (acide hyaluronique-poly(N-isopropylacrylamide), polyvinyles alcool etc.)[119]. Bien entendu, ces matrices

alternatives présentent aussi des limites. Par exemple, le N-isopropylacrylamide présente toxicité qu'il convient de prendre en compte[151].

Le manque de standardisation

Les protocoles de culture d'organoïdes utilisés par différentes équipes présentent de nombreuses similitudes. Néanmoins, on est encore très loin d'avoir une approche « standardisée » à l'échelle internationale. On voit en effet à travers le Tableau 1.6 que la durée de culture des organoïdes par exemple peut être très variable en fonction des études. On peut alors se poser la question de savoir quelle est la durée de culture optimale à appliquer dans le cadre d'un usage médical. On peut penser intuitivement que des organoïdes cultivés sur une trop courte période n'atteindraient pas un niveau suffisant de maturité et de complexité. Mais d'un autre côté, des organoïdes cultivés sur une période trop longue pourraient subir des altérations génétiques les rendant différents des tumeurs primaires[136]. Plus généralement, un grand effort d'optimisation et d'harmonisation des protocoles est nécessaire avant d'envisager une application à grande échelle de la technologie des organoïdes.

En conclusion, on peut dire que la technologie des organoïdes comme outil de modélisation préclinique est prometteuse mais encore largement perfectible. Par ailleurs, les contraintes techniques, financières et administratives associées à cette technologie la rendent simplement inaccessible à un certain nombre d'équipes de recherche. Aussi une autre approche de culture cellulaire en 3D commence à émerger comme outil de création de modèles tumoraux. Il s'agit de la bio-impression 3D. C'est ce dont nous allons parler dans le prochain paragraphe.

II.2.4. La bio-impression 3D

- **Introduction / Définition**

La bio-impression 3D peut être définie comme un ensemble de techniques de **fabrication additive** (**dépôt couche par couche**) permettant de créer des structures 3D **biologiquement fonctionnelles** à partir **de designs conçus sur ordinateur**. Pour imprimer ces structures, on utilise des « bio-encres » qui sont constituées de cellules utilisées seules ou en combinaison avec des **matériaux biocompatibles** (d'où la désignation de **bio**-impression)[152–155].

La bio-impression 3D partage beaucoup de similitudes avec l'impression 3D classique, notamment le fait que ce soit un **process assisté par ordinateur**. En effet, la bio-impression

fait appel à un certain nombre d'outils informatiques dans le but de : (i) concevoir le design de l'objet à imprimer et (ii) guider sa fabrication pour avoir un résultat aussi semblable que possible au design théorique. Ce recours à l'assistance par ordinateur est un avantage clé de la bio-impression 3D. Il la distingue des approches de culture cellulaire 3D que nous avons évoquées précédemment. En effet, cette technologie permet de créer des structures avec une architecture **complexe, contrôlable et reproductible**[156,157]. Par ailleurs, les matériaux et les cellules pouvant être utilisés *via* la bio-impression 3D sont très variés. Ceci offre de nombreuses possibilités quant aux propretés mécaniques et biologiques des structures à fabriquer[158].

Dans cette partie, nous commencerons par décrire brièvement les différentes approches de bio-impression 3D. La bio-impression par extrusion sera particulièrement détaillée car il s'agit de la technique utilisée dans le cadre de cette thèse. Ensuite, nous discuterons les applications de cette technologie en nous focalisant sur son usage pour la création de modèles tumoraux.

- **Les approches de bio-impression 3D**

Les techniques de bio-impression 3D peuvent être réparties en 4 grandes catégories selon le principe général utilisé[10] :

- ✓ La bio-impression par extrusion ;
- ✓ La bio-impression à jet d'encre ;
- ✓ La bio-impression assistée par LASER ;
- ✓ Les techniques de bio-impression basées uniquement sur la polymérisation photo-induite.

La bio-impression par extrusion

- ❖ Principe

La bio-impression par extrusion est l'approche de bio-impression la plus utilisée actuellement en ingénierie tissulaire de façon générale[159]. Son principe est relativement simple. La bio-encre à imprimer est soumise à une pression la forçant à sortir en filament continu à travers l'orifice d'une aiguille en mouvement (Figure 1.9). Ce mouvement, dirigé par ordinateur, permet de guider le dépôt du matériau pour réaliser la forme à imprimer. La quantité de matériau déposée peut être ajustée en modulant la pression exercée et/ou la vitesse de déplacement de l'aiguille[10]. La structure bio-imprimée doit ensuite être « réticulée » (crosslinking en anglais). La réticulation est un procédé physique (Ex. Rayons ultra-violets) ou

chimique (Ex. Traitement par une solution ionique) visant à solidifier la structure pour maintenir sa forme tout au long de sa période de mise en culture[160].

❖ Variantes techniques

En fonction de la nature de la pression appliquée, on distingue deux types de bio-impression par extrusion[161] (Figure 1.9) :

- ✓ L'extrusion sous pression pneumatique : De l'air comprimé est utilisé pour induire l'extrusion de la bio-encre.
- ✓ L'extrusion sous pression mécanique : La bio-encre est soumise à une force mécanique induite par un piston ou une vis sans fin. Il convient de bien distinguer ces deux approches. L'extrusion avec une vis sans fin est en effet le seul système de dosage, le plus précis également.

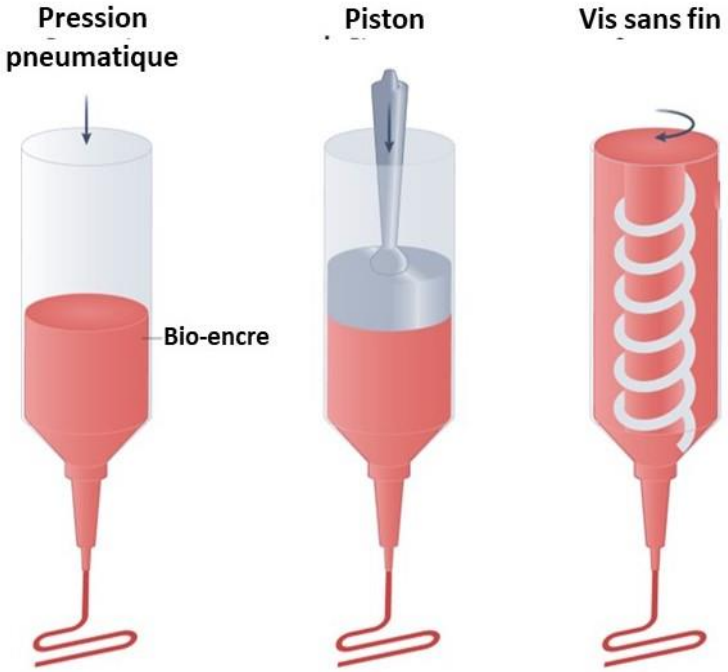


Figure 1.9. Principe et variantes de la bio-impression par extrusion[162].

La poussée pneumatique est la plus difficile à rendre stable. La vis sans fin est la seule à permettre la rétractation et l'arrêt de l'écoulement permettant un dépôt de matière avec une très bonne précision.

❖ Paramètres associés à la bio-impression par extrusion

Quel que soit la technique considérée, la bio-impression par extrusion fait intervenir plusieurs paramètres différents. Ceux-ci incluent notamment **la pression d'extrusion**, **la vitesse de déplacement de l'aiguille et son diamètre** ainsi que **la température de la bio-encre**[163].

L'ensemble de ces paramètres doivent être optimisés en vue de garantir la qualité du processus de bio-impression. Cette « qualité » s'exprime concrètement à travers deux aspects très importants : l'imprimabilité (ou printability en anglais) et la viabilité cellulaire.

1. L'imprimabilité

L'imprimabilité peut être définie comme étant la capacité à former et à maintenir une structure 3D à partir de la bio-encre de manière reproductible en utilisant une approche de bio-impression[160]. Plus précisément, l'imprimabilité est liée à la capacité de la matière à générer un objet 3D ayant certaines figures de mérites : surplomb, pont, hauteur. Cette capacité est liée à la valeur de la contrainte seuil statique de la matière utilisée, autrement dit sa capacité à supporter une certaine force sans s'effondrer. L'imprimabilité dépend des propriétés rhéologiques de la bio-encre et des paramètres du process de bio-impression[164].

2. La viabilité cellulaire

La viabilité cellulaire est généralement exprimée en pourcentage de cellules vivantes (par rapport au nombre total de cellules) dans les structures obtenues à l'issue du processus de bio-impression. Plusieurs paramètres peuvent affecter la viabilité des cellules au cours de l'extrusion[165]. Au cours du processus d'impression, les cellules et les biomatériaux sont en effet extrudés par une aiguille sous l'effet d'une force. La force d'impression peut produire des contraintes de cisaillement. Si ces contraintes dépassent un certain seuil, elles peuvent rompre les membranes des cellules[165]. La contrainte de cisaillement est influencée par la viscosité de la bio-encre, de son débit d'extrusion à travers l'aiguille d'impression et du diamètre de cette dernière[165].

❖ Importance de la rhéologie de la bio-encre dans la bio-impression par extrusion

L'étude de la rhéologie est d'une grande importance pour l'impression 3D par extrusion car, tout au long du processus d'impression, le matériau est exposé à diverses forces externes qui ont un impact considérable sur ses propriétés et son comportement. Par conséquent, les propriétés rhéologiques du matériau déterminent sa capacité à être extrudé par la buse d'impression et son comportement au cours du processus d'impression. La viscosité du matériau d'impression et ses propriétés d'amincissement par cisaillement, par exemple, déterminent la facilité avec laquelle il peut s'écouler à travers la buse et affectent sa capacité à conserver sa forme après l'extrusion. L'élasticité du matériau déterminera également la façon dont il réagira aux contraintes et aux déformations pendant l'impression. Par ailleurs,

différents paramètres tels que l'amincissement par cisaillement, la thixotropie, la viscoélasticité et le mécanisme de gélification sont fondamentaux, et une bonne compréhension des propriétés rhéologiques est nécessaire pour optimiser le processus d'impression et obtenir la qualité et la précision souhaitées pour le produit final[166,167].

Les bio-encres peuvent contenir des hydrogels, des composants matriciels décellularisés, des cellules ou même des sphéroïdes cellulaires. Les hydrogels en particulier sont très utilisés dans la formulation des bio-encres[165]. Ceci s'explique par leur capacité à fournir un environnement adéquat pour l'adhésion, la croissance et la prolifération des cellules vivantes[165]. La principale caractéristique des hydrogels est leur capacité à absorber et à retenir de grandes quantités d'eau. Ce sont par ailleurs des fluides non newtoniens qui s'amincissent sous l'effet du cisaillement et ont un comportement thixotropique. Ces caractéristiques les rendent convenables au processus d'extrusion. En effet, l'amincissement par cisaillement permet à la force de cisaillement d'aligner les chaînes de polymères aléatoires dans une seule direction facilitant ainsi son extrusion. La thixotropie, un comportement d'amincissement par cisaillement dépendant du temps, permet aux hydrogels de présenter une faible viscosité pendant l'impression et de retrouver leur stabilité après l'extrusion[168].

La viscoélasticité est également un facteur déterminant dans la bio-impression. L'impression de matériaux peu visqueux conduit à des structures « molles » et avec une faible intégrité structurale. A l'inverse, les matériaux très visqueux sont difficile à extruder[169,170]. L'évaluation de la relation entre la contrainte de cisaillement et la viscosité sous un taux de cisaillement donné fournit donc des informations importantes pour l'étude de l'imprimabilité des bio-encres[171].

- Avantages et limites de la bio-impression par extrusion

La bio-impression par extrusion peut être adaptée à des matériaux de viscosité différentes. En fonction de l'aiguille utilisée, elle peut s'appliquer à des bio-encres à forte densité cellulaire (jusqu'à 10^7 cellules/mL) voire à des bio-encres contenant des agrégats cellulaires ou des sphéroïdes préformés[152,172]. Ce procédé offre aussi la possibilité de combiner plusieurs types cellulaires en une même structure[173]. Ceci peut se faire soit (i) en combinant les différentes populations dans une bio-encre ou (ii) en imprimant avec plusieurs bio-encres contenant des types cellulaires distincts. En effet, la plupart des bio-imprimantes à extrusion disponibles

dans le commerce sont équipées de plusieurs têtes de bio-impression pouvant contenir chacune un matériau différent[159] (Figure 1.10).



Figure 1.10. Bio-imprimante à extrusion commerciale avec trois têtes d'impression[174].

L'extrusion suscite aussi l'intérêt des chercheurs en raison de sa capacité à créer des structures macroscopiques (à l'échelle des organes humains). Ceci la rend intéressante pour des applications en médecine régénérative[175]. Enfin la coextrusion ou extrusion coaxiale, une variante de l'extrusion classique, permet de créer des formes cylindriques constituées de plusieurs conches concentriques de composition différente. Elle a notamment été exploitée pour construire des structures vasculaires[176].

La bio-impression par extrusion présente néanmoins un certain nombre de limites. D'abord et comme nous l'avons évoqué plus haut, il est très important d'optimiser le process de bio-impression pour maintenir une bonne viabilité cellulaire. Or, cette phase d'optimisation peut s'avérer complexe et chronophage étant donné le grand nombre de paramètres à considérer (pression d'impression, vitesse, température, viscosité de la bio-encre, etc.). De plus, si l'extrusion permet de réaliser des structures macroscopiques (mm ou cm), elle est au contraire incapable de réaliser des structures très fines (moins de 100 µm)[177]. Le diamètre du filament de bio-encre déposé au cours de l'extrusion dépend directement du diamètre de la

buse d'impression utilisée. Or, plus celui-ci est petit, plus la pression d'extrusion nécessaire sera grande (et l'impact sur la viabilité cellulaire également)[178]. Donc concrètement, si on peut utiliser l'extrusion pour imprimer un tissu macroscopique, il faut recourir à une autre approche pour créer le réseau capillaire associé à ce tissu (le diamètre d'un capillaire étant généralement inférieur à 10 µm[179]).

La bio-impression à jet d'encre

Dans cette approche, la bio-encre est projetée sous forme de gouttelettes à travers une buse sous l'action d'un dispositif thermique ou piézoélectrique. Le mouvement de la buse au fur et à mesure du dépôt des gouttelettes va permettre de construire la forme 3D à bio-imprimer[10] (Figure 1.11).

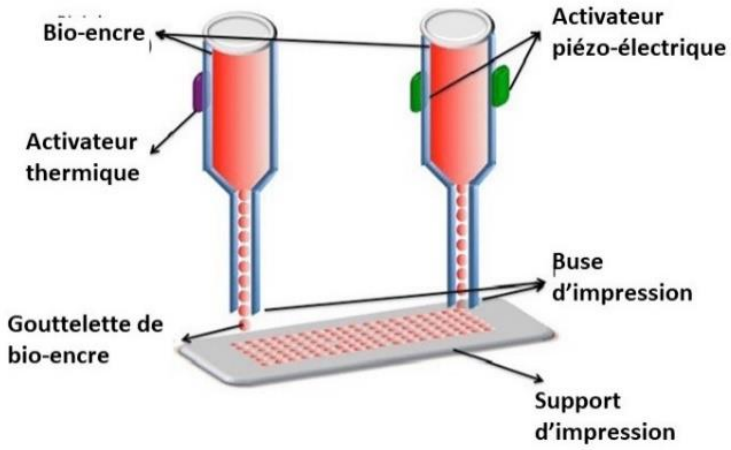


Figure 1.11. Principe de la bio-impression à jet d'encre[180].

Par rapport à l'extrusion, cette technique est décrite comme ayant un certain nombre d'avantages. La vitesse de bio-impression y est plus importante et le coût des bio-imprimantes à jet d'encre est relativement modéré[181].

Cependant, pour qu'une bio-encre puisse être projetée sous forme de gouttelettes, il faut que sa viscosité soit faible (idéalement inférieure à 10 mPa.S). Pour ce faire, la densité cellulaire de la bio-encre doit être limitée à moins de 10^6 cellules / mL[182]. De plus, les forces appliquées pour générer les gouttelettes peuvent affecter la viabilité cellulaire[10].

Par ailleurs, il convient de mentionner un autre inconvénient qui est **d'ailleurs commun à l'extrusion et à la bio-impression à jet d'encre**. Il s'agit du problème d'obstruction des aiguilles ou des buses au cours de l'impression[10]. Ceci peut se produire pour différentes

raisons (température de la bio-encre non homogène, présence de résidus ou d'agrégats cellulaires volumineux). Or ce phénomène impacte la qualité des structures bio-imprimées.

La bio-impression assistée par LASER

Le principe de cette technique est illustré par la Figure 1.12 . La bio-encre est déposée en fine couche sur la face inferieure d'une surface métallique. Lorsqu'une zone donnée de cette surface métallique reçoit un rayon LASER, la température de cette zone va augmenter. L'air emprisonné entre la couche de métal et la couche de bio-encre se dilate alors formant une bulle qui projeté la bio-encre sous forme de gouttelettes. Celles-ci sont alors recueillies sur le support d'impression pour constituer la structure 3D à imprimer[183].

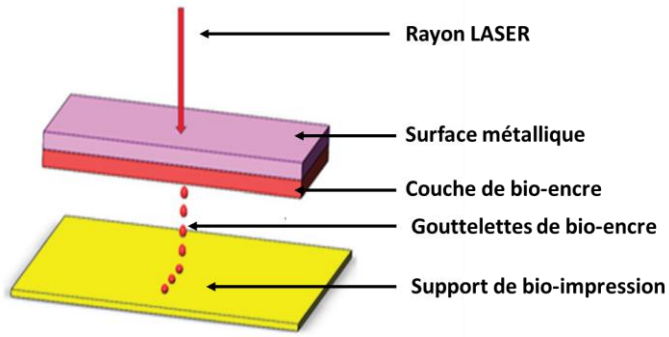


Figure 1.12. Principe de la bio-impression assistée par LASER[10].

Cette technique n'a pas recours à l'usage d'une aiguille ou une buse d'impression. Elle permet donc de s'affranchir des problèmes d'obstruction rencontrés dans les deux approches précédentes. Le dépôt des gouttelettes de bio-encre est par ailleurs plus précis comparativement à la bio-impression à jet d'encre.

La bio-impression assistée par LASER pose cependant d'autres problèmes. D'abord, le matériel utilisé est coûteux et nécessite des compétences spécifiques. Par ailleurs, des résidus métalliques peuvent être retrouvés dans les structures bio-imprimées[10].

Les techniques de bio-impression basées uniquement sur la polymérisation photo-induite

Il s'agit d'un ensemble de techniques comprenant notamment : (i) la stéréolithographie ; (ii) la bio-impression par traitement numérique de la lumière (Digital Light Processing ou (DLP) en anglais) ; (iii) la photopolymérisation a deux photons (Two-Photon Polymerization ou (TPP) en anglais). Chacune de ces techniques possède ses propres spécificités mais elles font appel au même principe de base. Elles ont recours à des bio-encres qui se polymérisent au contact de la lumière à une longueur d'onde donnée. Par exemple dans le cas de la stéréolithographie

(Figure 1.13), la bio-encre est contenue dans une cuve puis exposée à un faisceau lumineux. Celui-ci peut être orienté *via* un miroir dont le mouvement est contrôlé par ordinateur. Le faisceau lumineux commence par polymériser une première couche de bio-encre. Ensuite, la cuve descend d'une certaine hauteur pour que le faisceau soit de nouveau en contact avec de la bio-encre non polymérisée. Ainsi, la polymérisation de la bio-encre s'effectue en couches successives jusqu'à la réalisation de la structure à bio-imprimer[184].

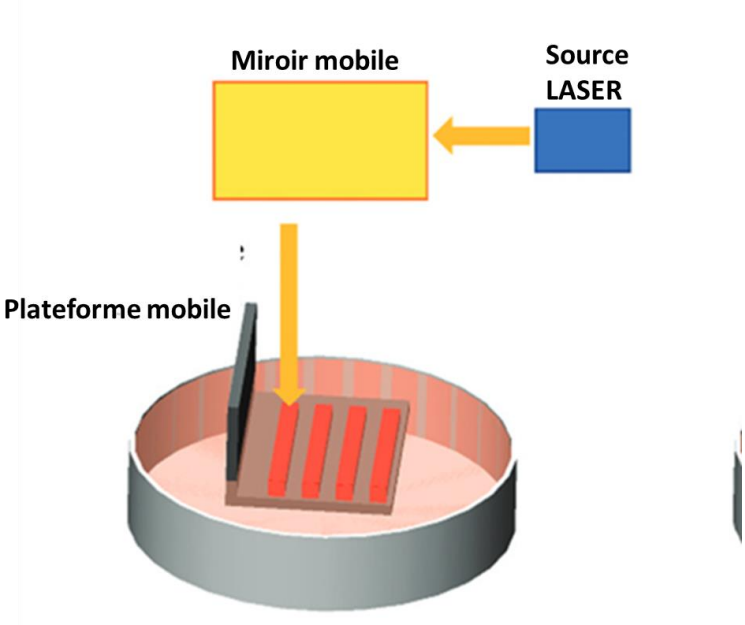


Figure 1.13. Principe de la stéréolithographie[10].

Les techniques de polymérisation photo-induite permettent de bio-imprimer des structures avec une très grande précision (une couche peut atteindre jusqu'à 1 µm d'épaisseur)[10]. Toutefois, elles ont un certain nombre d'inconvénients qui expliquent probablement pourquoi leur usage reste relativement restreint.

D'abord et de par leur principe, ces techniques nécessitent l'usage de matériaux photo-polymérisables. Ceci limite le choix des bio-encres compatibles. Par ailleurs, le potentiel impact de la lumière sur la viabilité cellulaire doit également être souligné. Enfin, le coût et la complexité de ces procédés contribuent probablement à limiter leur application à grande échelle[10].

Remarque

Certaines approches de bio-impression par extrusion ou à jet d'encre peuvent recourir à la lumière pour induire la réticulation d'une structure après son impression. Mais ces applications sont différentes des techniques de bio-impression basées uniquement sur la polymérisation photo-induite où la lumière intervient pour la réalisation même de la structure 3D à imprimer.

Le Tableau 1.7 présente une comparaison à différents niveaux entre les techniques de bio-impression 3D

Tableau 1.7. Comparaison des différentes techniques de bio-impression 3D[10].

	Extrusion	**Jet d'encre**	**Bio-impression par LASER**	**Photopolymérisation uniquement**
Choix des matériaux utilisables	Large	Restreint	Intermédiaire	Restreint
Densité cellulaire	Forte (jusqu'à 10^8 Cell./mL) / Agrégats cellulaire	Faible (moins de 10^6 Cell./mL)	Intermédiaire	Intermédiaire
Qualité d'impression	Bonne	Mauvaise	Intermédiaire	Bonne
Coût	Intermédiaire	Faible	Elevé	Elevé
Vitesse d'impression	Faible	Elevée	Elevée	Elevée
Résolution	Faible	Elevée	Elevée	Elevée

A travers l'analyse du Tableau 1.7, il apparait que la bio-impression par extrusion présente le meilleur compromis entre performances techniques d'un côté, cout et facilité d'utilisation de l'autre. Même si elle présente une faible résolution d'impression, sa capacité à s'adapter à un large choix de matériaux et à une forte densité cellulaire la rendent intéressante pour la création de modèles tumoraux.

- **Application de la bio-impression 3D à la modélisation du cancer ovarien**

Bien que la bio-impression 3D soit de plus en plus utilisée pour la création de modèles cancéreux[185], elle a encore très peu été appliquée à la modélisation du cancer ovarien. Ainsi

au moment de la rédaction de ce manuscrit (Juin 2023) et au meilleur de notre connaissance, un seul article scientifique a été publié dans ce sens en 2011[186].

Dans celui-ci, Xu *et al.*[186] ont développé un dispositif comprenant deux systèmes d'injection sous pression pneumatique. Ils ont utilisé ce dispositif pour déposer des gouttelettes de deux suspensions cellulaires sur une couche de Matrigel®. A chaque fois, une gouttelette contenant des cellules cancéreuses ovariennes (OVCAR-5) était déposée à proximité d'une gouttelette contenant des fibroblastes (MRC-5) (Figure 1.14).

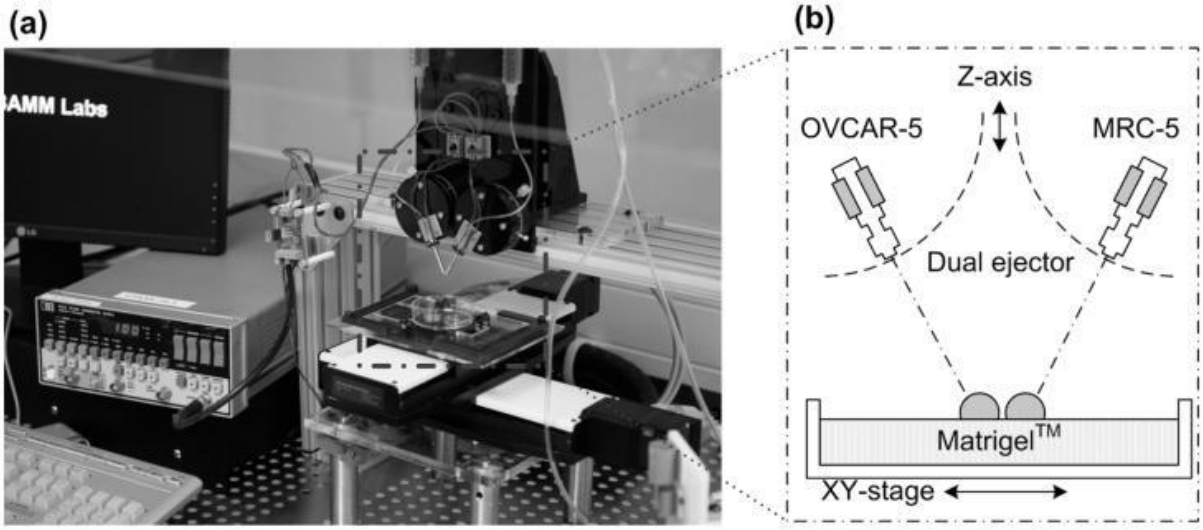


Figure 1.14. Le montage expérimental décrit dans l'étude de Xu *et al.*[186]. (a). Photo du dispositif utilisé. (b). Schéma du dispositif. On peut y avoir les 2 systèmes d'injection pneumatiques contenant des cellules OVCAR-5 ou MAR-5. Les cellules sont déposées en gouttelettes sur un support de Matrigel®.

Dans cette étude les chercheurs ont essentiellement mis l'accent sur la capacité de ce dispositif à générer des gouttelettes de manière rapide et reproductible. La viabilité cellulaire au sien de ces gouttelettes a également été évaluée.

Ici, il ne s'agit pas de bio-impression *stricto sensu* dans la mesure où les cellules ne sont pas réellement incorporées dans un biomatériau pour constituer une bio-encre. Néanmoins à travers cet exemple, on peut déjà mesurer l'intérêt de recourir à des systèmes automatisés pour la création de modèles tumoraux ovariens. Ceci se reflète notamment par un gain significatif en précision, efficacité et reproductibilité.

Cependant dans cet article, les aspects biologiques du modèle tumoral ont été très peu caractérisés. Par exemple, l'expression des marqueurs phénotypiques des deux types

cellulaires n'a pas été étudiée. Les éventuelles interactions entre les cellules cancéreuses et les fibroblastes n'ont pas été décrites non plus. **Les portes restent donc grandes ouvertes pour étudier l'applicabilité et l'intérêt de la bio-impression 3D dans le cadre de la modélisation des cancers ovariens**.

- **Application de la bio-impression 3D aux autres types cancéreux**

Etant donné la rareté des exemples décrivant l'application de la bio-impression 3D au cancer ovarien, nous avons fait le choix d'aborder, dans ce titre, des exemples se rapportant à d'autres types cancéreux. Le but est de permettre au lecteur d'avoir un aperçu plus large et plus clair du potentiel et des applications de cette technologie dans la création de modèles cancéreux.

Dans le Tableau 1.8 ci-dessous, nous proposons une classification des publications les plus récentes (2012 – 2023) dans ce domaine en fonction du champ d'application et du type cancéreux étudié.

Tableau 1.8. Exemples d'application de la bio-impression 3D pour la création de modèles cancéreux.

Champs d'application	**Type de cancer étudié**	**Réfs.**
Reproduction du TME pour évaluer l'activité de molécules thérapeutiques.	Glioblastome et autres cancers du cerveau ou d'origine neurologique	[7,187–189]
	Cancer du sein	[190]
	Cancer colorectal	[191,192]
	Mélanome malin	[193]
	Myélome multiple	[194]
Simulation du TME pour étudier les interactions entre les cellules cancéreuses et des nanoparticules.	Cancer du sein (lignée cellulaire MCF-7)	[195]
Etude des connexions et des interactions cellulaires au sein du TME.	Cancer du rein	[196]

Etude du rôle du système immunitaire dans la physiopathologie cancéreuse et identification / évaluation de stratégies d'immunothérapie ou de cibles immunologiques.	Glioblastomes ou cancers d'origine neurologiques	197–199
Modélisation et étude des processus impliqués dans la vascularisation tumorale.	Glioblastomes	200
Etablissement de modèles 3D visant à étudier la migration et le potentiel d'invasion des cellules cancéreuses.	Plusieurs lignées cancéreuses (sein, poumon, ovaire)	201
	Cancer du poumon	202
	Ostéosarcome (cancer osseux)	203
Etude des processus et phénomènes impliqués dans la chimiorésistance (rôle des cellules souches, marqueurs de la chimiorésistance).	Cancer du sein	204,205
	Gliomes	206
Etude des interactions entre les cellules cancéreuses et les adipocytes qui sont des acteurs majeurs du TME dans le cancer du sien.	Cancer du sein	207,208

L'analyse du Tableau 1.8 permet de se rendre compte de la diversité des travaux faisant appel à la bio-impression 3D pour la création de modèles tumoraux. Les types cancéreux étudiés sont également très divers ce qui illustre la polyvalence de cette technologie. On note cependant une nette prédominance des travaux relatifs aux cancers du cerveau et du sein.

Pour mieux se rendre compte des avantages et des limites des modèles tumoraux bio-imprimés en 3D, nous proposons dans le

Tableau **1.9** une discussion plus détaillée de certains exemples. Certains des travaux sélectionnés sont relatifs à l'usage de modèles tumoraux bio-imprimés dans l'évaluation

d'agents thérapeutiques. D'autres abordent l'étude de processus pathologiques comme l'angiogenèse ou la migration des cellules cancéreuses.

Tableau 1.9. Analyse d'exemples de modèles tumoraux bio-imprimés en 3D.

Réf. / Année	**Description globale et but de l'étude**	**Technologie(s) de bio-impression ; matériaux et cellules utilisés**	**Résultats, discussion et limites de l'étude**
[7] / 2021	Création d'un modèle de glioblastome en vue de l'utiliser comme outil préclinique. Ce modèle comprenait plusieurs types cellulaires et un réseau vasculaire perfusable (pourvu d'une lumière vasculaire) (Figure 1.15). Les profils de croissance et l'expression génétique des cellules cancéreuses y ont été étudiés en comparaison avec des cellules cultivées en 2D et des modèles animaux. Ce modèle a finalement été utilisé pour évaluer la réponse au	- Bio-imprimante à extrusion ; - **Pour la partie cancéreuse du modèle** : une bio-encre constituée de fibrinogène et de gélatine dans laquelle ont été encapsulées : (i) des cellules cancéreuses de glioblastomes dérivées de patients ; (ii) des astrocytes et (iii) des cellules microgliales. - **Pour la partie vasculaire du modèle** : Un polymère synthétique	Ce modèle comprend 5 types cellulaire différents (penta-culture) et un réseau vasculaire luminal. Il atteint donc un haut niveau de complexité permis par la flexibilité de la bio-impression 3D. Comparés aux cultures en 2D, les profils de croissance des cellules cancéreuses dans le modèle bio-imprimé ainsi que leurs profils transcriptomiques se sont avérés plus proches de ceux observés *in vivo*. En comparaison avec la culture en 2D, ce modèle a également pu reproduire les réponses des cellules cancéreuses au témozolomide de manière plus prédictive (données observées en 3D analogues aux données cliniques). Ce modèle peut donc également être envisagé comme un outil pour la médecine de précision. Les limites suivantes peuvent être soulignées :

	témozolomide (agent alkylant préconisé dans le traitement des glioblastomes).	(Pluronic F127) a été utilisé comme matériau sacrificiel pour créer le réseau luminal. Des cellules endothéliales et des péricytes ont ensuite été utilisées pour recréer l'endothélium vasculaire (Figure 1.15).	- Le rôle des cellules de l'immunité n'est pas pris en compte dans cette étude ; - La technique visant à créer et à connecter le réseau vasculaire est relativement complexe. Ceci peut limiter la production à grande échelle de ce modèle.

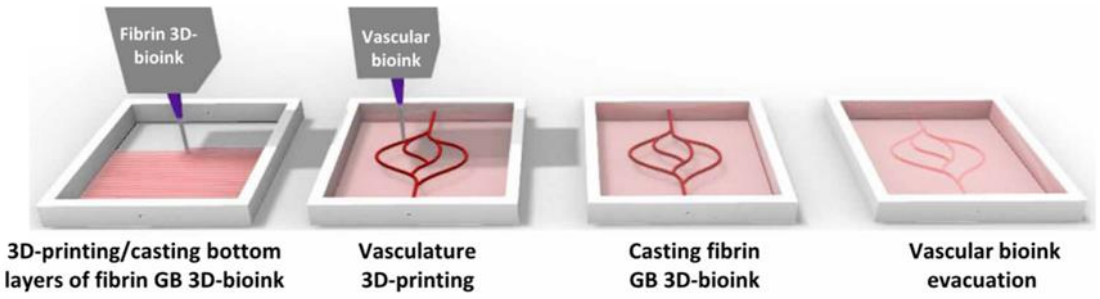


Figure 1.15. Schéma et étapes d'élaboration du modèle décrit par Neufeld *et al.*[7]. La première étape consiste à imprimer la partie cancéreuse. La 2ème étape consiste à imprimer la structure vasculaire avec un matériau sacrificiel. Dans la 3ème étape, une réticulation de la structure cancéreuse est effectuée. Enfin dans la 4ème étape, le matériau sacrificiel est éliminé pour constituer la lumière vasculaire qui sera ensuite ensemencée avec des cellules endothéliales et des péricytes.

[190] / 2022	Cet exemple propose une étude comparative entre plusieurs modèles de cancer du sein : un modèle bio-imprimé ; des cultures en 2D ; des sphéroïdes et des xénogreffes.	- Bio-impression par extrusion - Bio-encre : un mélange (alginate de sodium + gélatine) dans lequel ont été encapsulées des cellules cancéreuses du	Les modèles bio-imprimés ont continué à proliférer jusqu'à 17 jours après bio-impression. Des similitudes morphologiques avec les tumeurs obtenues *in vivo* ont pu être observées (caractéristiques histologiques, formation de structures luminales). Lors de leur transplantation à des souris immunodéficientes, les structures bio-imprimées ont pu former des

	La comparaison a notamment porté sur la viabilité cellulaire et la réponse à différents agents thérapeutiques en monothérapie et en combinaison. Le profil d'expression d'un grand nombre de protéines métaboliques a également été évalué et comparé au sein des différents modèles.	sein (lignée ZR75.1).	tumeurs vascularisées (potentiel tumorigène). En comparaison avec les cultures 2D **et les sphéroïdes**, les structures bio-imprimées ont également montré des profils d'expression protéique et de réponse thérapeutique plus évocateur de ceux observés *in vivo*. En termes de complexité biologique, ce modèle reste néanmoins limité dans la mesure où il ne reprend pas d'éléments vasculaires ou immunitaires. Mais il parvient quand même à atteindre un niveau de prédictivité supérieur à celui des sphéroïdes obtenus avec les mêmes cellules.
[194] / 2022	Un modèle de myélome multiple (cancer hématologique donnant des atteintes osseuses) est bio-imprimé. Ce modèle est utilisé pour étudier le rôle du TME et en particulier le rôle de l'interleukine 6 (IL-6). Sur la base des résultats obtenus, des agents thérapeutiques ont été testés sur ce modèle. Ceux-ci comprenaient le bortézomib (un inhibiteur du protéasome) et le	- Une approche de bio-impression **par coextrusion** - Le modèle se présente sous forme d'un cylindre constitué de **2 couches concentriques (**Figure 1.16**)** : (i) une couche externe **représentant la partie minérale de l'os** et (ii) une couche interne représentant **la moelle osseuse** où prolifèrent les cellules	Via ce modèle, il a été démontré que la configuration tridimensionnelle favorisait la prolifération des cellules cancéreuses. Par ailleurs, ces cellules proliféraient plus rapidement en présence de cellules stromales. Les cellules stromales ont également renforcé la résistance des cellules cancéreuses au bortézomib. Cet effet a été plus marqué en 3D qu'en 2D (en 3D, la différence de réponse entre monoculture et coculture était plus visible). L'association du tocilizumab au bortézomib a significativement potentialisé l'effet cytotoxique de ce dernier en coculture. Par contre, aucun effet de synergie n'a été observé en monocultures. Ici aussi l'effet de synergie en coculture a été plus clairement visible en 3D

	tocilizumab (anticorps monoclonal dirigé contre le récepteur de l'IL-6).	cancéreuses du myélome multiple. - Pour la couche externe, les auteurs ont utilisé un mélange complexe de matériaux contenant notamment de **l'hydroxyapatite**. - Pour la partie centrale, la bio-encre utilisée comprenait des cellules cancéreuses (Lignée MM1S **ou** lignée RPMI-8226) et des cellules stromales (lignée HS-5) encapsulées dans un hydrogel de gélatine-méthacryloyl (GelMA).	comparativement aux cultures 2D. Des cellules cancéreuses dérivés de patients atteints de myélome multiple ont également pu être cultivées sur plus de 7 jours dans le modèle bio-imprimé en 3D. En 2D, leur maintient en culture était impossible au-delà de 5 jours. Cet exemple permet de bien illustrer l'intérêt de la 3D et des cellules stromales dans la modulation de la prolifération des cellules cancéreuses et de leurs réponses aux agents thérapeutique. Le modèle décrit ici présente néanmoins quelques limites. Par exemple, il ne prend pas en compte le rôle des adipocytes médullaires qui semblent pourtant intervenir dans la physiopathologie du myélome multiple[209]. Par ailleurs et comme ce modèle ne reprend que le compartiment médullaire, il ne permet pas de rendre compte des atteintes rénales qui constituent un aspect très important dans cette maladie[210].

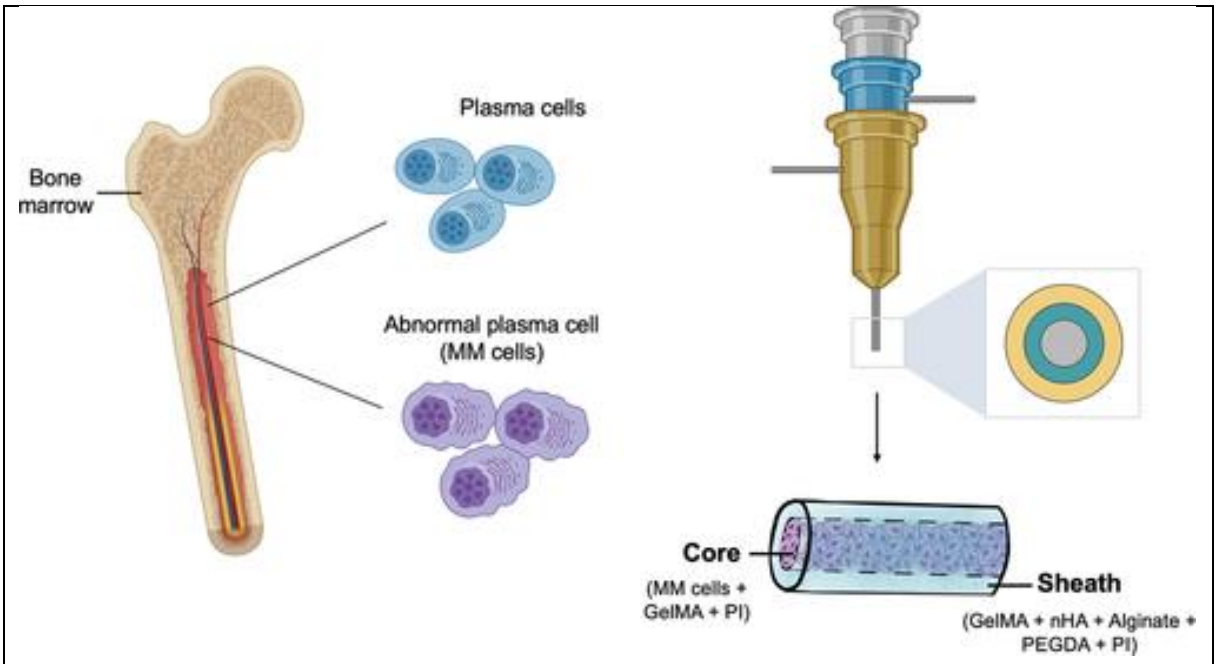


Figure 1.16. Le modèle de myélome multiple décrit par Wu *et al.*[194]. A gauche : une représentation du microenvironnement tumoral du myélome multiple caractérisé par la prolifération de lymphocytes B plasmiques malins au sein de la moelle osseuse. A droite : le modèle bio-imprimé par extrusion coaxiale. Celui-ci est constitué de 2 couches concentriques.

A travers le

Tableau **1.9**, nous pouvons mieux visualiser le potentiel de la bio-impression 3D dans la création de modèles tumoraux. Les exemples que nous avons sélectionnés visent chacun à illustrer un aspect particulier de ce potentiel. Nous pouvons résumer cela de la manière suivante :

- ✓ A travers l'exemple 1 (Réf. [7]), nous pouvons apprécier la capacité de la bio-impression 3D à générer des modèles hautement complexes avec plusieurs types cellulaires (5 dans cet exemple). La possibilité de créer un réseau vasculaire perfusable permet également d'optimiser la viabilité cellulaire au sein du modèle ;

- ✓ A travers l'exemple 2 (Réf. [190]), on peut illustrer la prédictivité des modèles tumoraux bio-imprimés en 3D. Ces modèles sont, en effet, ceux qui se sont rapprochés le plus des observations faites i*n vivo* comparativement aux cultures 2D et aux sphéroïdes. Cette similitude concerne aussi bien les profils d'expression protéique que les réponses thérapeutiques ;
- ✓ A travers l'exemple 3 (Réf. [194]), on peut illustrer l'intérêt de la bio-impression par coextrusion. La possibilité de bio-imprimer simultanément plusieurs matériaux différents permet de reproduire des tissus constitués de plusieurs compartiments avec des propriétés mécaniques et biologiques différentes (Ex. partie minérale de l'os et moelle osseuse). L'exemple permet également d'illustrer l'intérêt des modèles bio-imprimés dans la mise au point de nouvelles stratégies thérapeutiques basées sur des phénomènes de synergie.

A l'instar des autres techniques de culture cellulaire en 3D, la bio-impression présente également des limites qu'il convient de signaler. Ces limites peuvent être résumées de la façon suivante :

- ✓ Le coût associé à l'équipement (la bio-imprimante 3D) : C'est un investissement initial qu'il faut prendre en considération. Le coût des bio-imprimantes varie de quelques milliers à plusieurs centaines de milliers d'euros en fonction des technologies et des options incluses dans l'équipement. Cependant hors-mi cet investissement initial, les modèles bio-imprimés en 3D peuvent être avantageux sur le plan financier. En effet, ceux-ci ne requièrent pas nécessairement des facteurs de croissance ou des milieux particuliers (contrairement aux organoïdes par exemple) ;
- ✓ La conception d'un modèle bio-imprimé requière une phase d'optimisation indispensable. Celle-ci porte sur plusieurs aspects tels que : le biomatériau à utiliser ; les paramètres d'impression ; les milieux à utiliser en cas d'association de plusieurs types cellulaires etc. Cette phase d'optimisation peut être plus longue que pour d'autres technologies. Par exemple, la génération de sphéroïdes en plaques antiadhésives nécessitera souvent moins d'optimisation que la génération d'un modèle bio-imprimé ;

- ✓ La bio-impression est une technologie assistée par ordinateur. Ceci fait sa force mais constitue aussi, dans une certaine mesure, une faiblisse. En effet, la réalisation d'un modèle tumoral bio-imprimé nécessite la parfaite maitrise de ce « volet informatique ». Ceci va du design 3D à la gestion des fichiers .gcode. Des compétences spécifiques dans ce sens doivent donc être disponibles pour tirer le meilleur profit de cette technologie.

II.2.5. Discussion générale des approches de culture cellulaire en 3D

Comme nous avons pu le voir, les différentes approches de culture cellulaire en 3D ont toutes leurs avantages et leurs limites. Dans l'ensemble, ces techniques ont néanmoins permis d'améliorer le niveau de complexité des modèles tumoraux comparativement à la culture cellulaire en 2D.

Cependant, les approches de culture cellulaire en 3D peinent encore à prendre en compte un aspect très important de la physiologie humaine. **Il s'agit de l'aspect « dynamique »**. Cet aspect concerne notamment l'ensemble des mouvements nécessaires au fonctionnement du corps humains comme la circulation du sang dans les vaisseaux ; les mouvements respiratoires ou le péristaltisme digestif.

Ces mouvements sont bien entendu indispensables au bon fonctionnement du corps humain. Ils jouent aussi un rôle très important **dans la physiopathologie des maladies et notamment des maladies cancéreuses**[211].

Pour améliorer le biomimétisme et la prédictivité des modèles précliniques, il est donc indispensable que ces phénomènes dynamiques soient aussi pris en considération. Dans cette perspective, une nouvelle technologie d'ingénierie tissulaire a fait son apparition en 2010 et s'est considérablement développée depuis. Il s'agit de la technologie des organes sur puce (Organ-on-chip ou OoC en anglais). Cette technologie adapte les méthodes et les outils **de la microfluidique** pour mieux simuler *in vitro* les organes et tissus humains en prenant en compte leur complexité structurale mais aussi leur environnement dynamique.

La technologie des organes sur puce a d'abord été développée pour simuler des organes ou des tissus sains. Elle a ensuite rapidement été adaptée à la création de **modèles tumoraux**.

Ceux-ci sont généralement désignés comme étant des cancers sur puce (Cancer-on-Chip ou CoC en anglais).

Ces deux technologies seront abordées en détail dans le prochain paragraphe de ce chapitre bibliographique. Nous commencerons par définir les OoC et les CoC et décrire leurs avantages. Nous passerons ensuite en revue les matériaux et les procédés de fabrication utilisés. Enfin, nous aborderons les applications de cette technologie à la création de modèles cancéreux ovariens et leurs applications.

III. La microfluidique et la technologie OoC / CoC

III.1. De la microfluidique aux OoC

Pour comprendre le concept Organe / Cancer sur puce, il est important de définir, dans un premier temps, la microfluidique en tant que science et en tant que technologie.

La microfluidique est définie comme étant la science qui étudie le comportement de petits volumes de fluides (10^{-9} à 10^{-18} L) au sein de systèmes (canaux) de taille micrométrique[212]. Ces systèmes sont désignés comme étant des **systèmes microfluidiques** ou des « puces » microfluidiques. La microfluidique désigne également l'ensemble des technologies visant à fabriquer, à manipuler et à caractériser les systèmes microfluidiques.

D'un point de vue historique, l'essor de la microfluidique est en partie lié à celui de la microélectronique[212]. Cette dernière a en effet largement inspiré la microfluidique notamment en termes de procédés de fabrication. Par exemple, la photolithographie utilisée pour fabriquer les systèmes microfluidiques a d'abord été développée pour l'élaboration des puces électroniques. C'est d'ailleurs pour ça que les systèmes microfluidiques sont désignés comme étant des « puces » alors que, très souvent, ils ne contiennent aucun composé électronique[213].

Depuis ses débuts dans les années 1950 – 1960, la microfluidique a sollicité un grand intérêt dans de nombreux domaines. Dans un premier temps, c'est la chimie analytique qui s'y est intéressée. Les systèmes microfluidiques ont en effet incarné l'espoir de pourvoir effectuer plusieurs analyses différentes en utilisant un volume très réduit d'échantillon. Ainsi, cette technologie a été intégrée dans certaines techniques de chromatographie et d'électrophorèse[214].

Dans les années 1990, c'était au tour de la biologie moléculaire d'intégrer les approches de la microfluidique notamment dans l'étude des protéines[215] et des acides nucléiques[216].

Au début des années 2000, des travaux utilisant la microfluidique pour cultiver des cellules dans des conditions très contrôlées (oxygène, nutriments) ont été décrits[217]. Ces travaux ont pu laisser entrevoir le potentiel de cette technologie en ingénierie tissulaire.

Mais **c'est en 2010 que le concept d'organe sur puce a véritablement pris naissance** engendrant au passage une véritable révolution. Ce concept a été amené par la publication de Huh *et al.*[218] qui décrivait un modèle de poumon sur puce. Ce modèle a été développé par l'équipe du professeur Donald E. Ingberg (Université d'Harvard, Etats-Unis). Il visait à simuler *in vitro* la structure et la fonction de la Membrane Alvéolo-Capillaire (MAC) pulmonaire. Pour ce faire, un dispositif microfluidique constitué de 2 canaux superposés a été fabriqué (Figure 1.17). Les 2 canaux ont été séparés par une membrane microporeuse dont la surface a été modifiée avec du collagène. Des cellules épithéliales ont été cultivées sur la surface supérieure de cette membrane alors que des cellules endothéliales ont été cultivées sur sa surface inférieure. Du milieu de culture a ensuite été perfusé à travers le canal inférieur reproduisant ainsi le compartiment sanguin. Le canal supérieur reproduisant quant à lui le compartiment aérien. De plus, deux canaux latéraux ont été utilisés pour instaurer un vide permettant un étirement cyclique de la membrane microporeuse. Ceci avait pour but de reproduire les contraintes mécaniques associées aux mouvements respiratoires. Ainsi, ce modèle a pu simuler les acteurs cellulaires clés de la MAC mais aussi les phénomènes dynamiques qui la caractérisent (circulation sanguine, mouvements respiratoires).

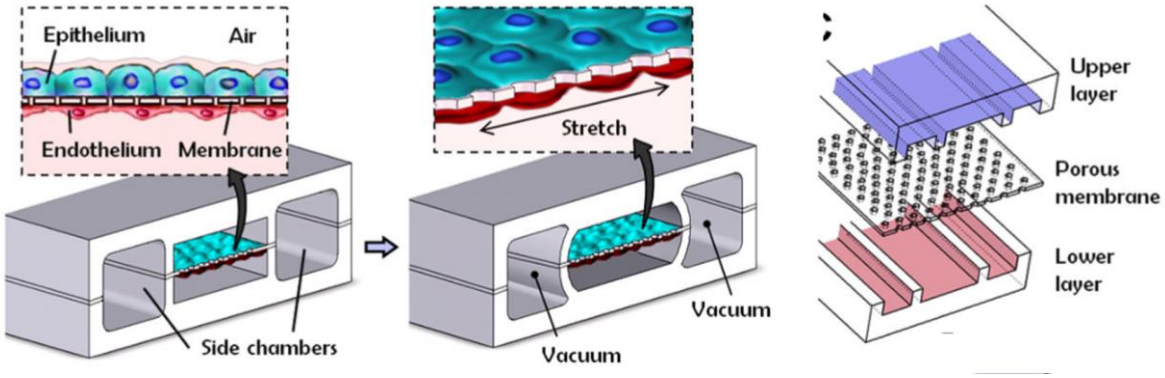


Figure 1.17. Le modèle de poumon sur puce développé par Huh *et al.*[218]. Le modèle est constitué de deux canaux superposés séparés par une memebrane microporeuse et de deux canaux latéraux.

Cet exemple permet d'illustrer le potentiel de la microfluidique dans la modélisation des tissus et organes humains. Ceci a d'ailleurs sollicité l'intérêt de multiples groupes de recherche à travers le monde. Ainsi depuis les années 2010, la technologie des organes sur puce a connu un développement considérable avec de multiples innovations à la clé comme nous allons le voir dans le prochain paragraphe.

III.2. Définition des OoC et des CoC

A la lumière de l'exemple décrit ci-dessus, nous pouvons évoquer la définition suivante pour les organes sur puce (OoC). Ce sont **des dispositifs microfluidiques** dans lesquels on cultive des cellules sous **conditions dynamiques** (perfusion sous flux physiologique, contraintes mécaniques…) en vue de reproduire *in vitro* la structure et le fonctionnement physiologique ou physiopathologique d'un organe, un tissu ou une unité fonctionnelle du corps humain[219].

Il convient néanmoins de souligner que la diversité des travaux dans ce domaine est telle que cette définition ne s'applique pas à tous les modèles décrits comme étant des « organes sur puce ». En effet, cette technologie étant relativement jeune, le concept d'organe sur puce semble encore difficile à définir avec précision.

Les cancers sur puce (CoC) quant à eux sont nés à partir de l'**adaptation de la technologie des OoC à l'étude du cancer**. Autrement dit, ce sont des OoC où on étudie un aspect structural ou fonctionnel de la pathologie cancéreuse. Ainsi les CoC décrits dans la littérature peuvent simuler le microenvironnement tumoral, les phénomènes de métastase, d'angiogenèse etc[220]. Là encore, la limite entre ce qu'est un CoC et ce qui ne l'est pas semble difficile à établir compte-tenu de la diversité des modèles décrits dans la littérature.

Néanmoins même si ces modèles sont très divers en fonction du design et des applications, ils font souvent appel aux mêmes matériaux et procédés de fabrication. C'est ce que nous allons aborder dans le prochain paragraphe.

III.3. Les matériaux pour la fabrication des OoC/CoC

III.3.1. Le Polydiméthylsiloxane ou PDMS

Depuis le premier modèle développé en 2010 et jusqu'à nos jours, le PDMS reste le « matériau de référence » pour la fabrication des OoC[221]. C'est un matériau polymère élastomère[222]. Sa structure chimique est illustrée par la Figure 1.18.

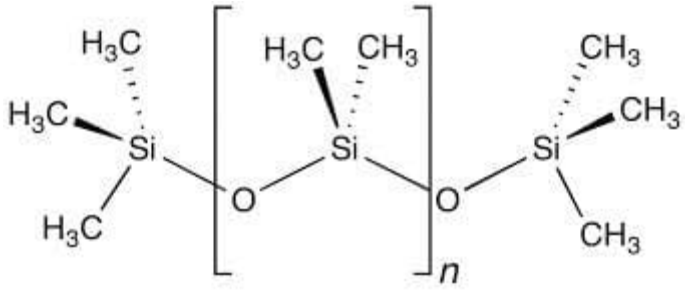


Figure 1.18. Structure chimique du polydiméthylsiloxane (PDMS)[223].

Ce matériau combine plusieurs propriétés intéressantes qui expliquent son usage très fréquent dans la fabrication des OoC/CoC[222] :

- ✓ Il est biocompatible et bio-inerte : Il ne présente pas de toxicité pour les cellules et n'interfère pas avec leur fonctionnement ;
- ✓ Il est chimiquement stable et résistant à la biodégradation ;
- ✓ Il se présente sous forme liquide (plus ou moins visqueuse) avant réticulation. Sa réticulation est possible *via* l'addition d'un agent réticulant suivie par un traitement thermique. Cette propriété permet la fabrication facile et rapide de puces en PDMS par une simple approche de moulage tout en offrant une grande flexibilité de design ;
- ✓ Il est perméable aux gaz ;
- ✓ Il est flexible et présente un comportement hyperélastique. Le PDMS peut en effet subir une grande déformation avant d'atteindre son point de rupture. Or, cette propriété est également retrouvée dans certains tissus biologiques ;
- ✓ Il est transparent permettant l'observation en microscopie optique en temps réel ;
- ✓ Il est très peu coûteux.

Cependant et en dépit de ses avantages, le PDMS présente aussi des limites qu'il convient de souligner. En raison des groupements méthyl entrant dans sa structure, ce matériau possède notamment un caractère hydrophobe important. L'angle de contact Θ mesuré sur une surface de PDMS non traitée est en effet d'environ 108° ± 7°[222]. Ce caractère fortement hydrophobe va avoir une double conséquence :

- ✓ La surface du PDMS non traitée n'est pas favorable à l'adhésion et à la croissance des cellules[224] ;

- ✓ Le PDMS possède un pouvoir adsorbant très important notamment vis-à-vis des petites molécules organiques comme les molécules médicamenteuses[225]. Ceci peut modifier la concentration des agents thérapeutiques dans les systèmes microfluidique. C'est donc un paramètre supplémentaire à prendre en compte lors de l'interopération des résultats expérimentaux.

Pour contourner ces difficultés, la surface du PDMS est généralement traitée pour augmenter son hydrophilie. Dans le domaine des OoC, deux types de traitement de surface sont souvent appliqués au PDMS : (i) l'oxydation par exposition à un plasma à oxygène et (ii) le traitement par des protéines de la matrice extracellulaire[226] (c'est souvent le mot anglais « **coating** » qui est employé. On parle de coating de la surface par des protéines). En raison de l'importance de ces deux procédés, nous avons jugé utile de les aborder brièvement.

- ➢ **Les méthodes de modification de surface du PDMS**

Le traitement par exposition à un plasma à oxygène

Lorsqu'une structure en PDMS est exposée à un plasma à oxygène, les groupements méthyl à sa surface sont oxydés. Ceci génère des groupements plus polaires tels que des groupements hydroxyles (-OH). La surface du PDMS devient ainsi plus hydrophile[222].

Ce traitement n'est pas durable dans le temps. En effet, à température ambiante, les chaines de polymères du PDMS sont mobiles. Ainsi, les chaines hydrophobes se trouvant dans la masse du matériau vont progressivement diffuser vers sa surface. La densité superficielle des groupements hydrophiles diminue alors progressivement. La surface finit par retrouver son hydrophobie initiale en quelques heures[227,228].

Outre l'amélioration de l'hydrophilie, le traitement par plasma à oxygène a une autre application très importante. Il permet le **scellement des dispositifs microfluidiques** *via* le collage PDMS – PDMS ou PDMS – verre[229].

Le coating par des protéines de la matrice extracellulaire

Les surfaces de PDMS peuvent être traitées avec des protéines de la matrice extracellulaire pour favoriser l'adhésion et la croissance des cellules[230]. Ces traitements améliorent également le biomimétisme des OoC. Les protéines de l'ECM jouent effectivement un rôle clé *in vivo* tant sur le plan physiologique que sur le plan physiopathologique. Il est donc important de les prendre en compte dans la conception des modèles précliniques. Les protéines les plus

souvent utilisées dans le domaine des OoC/CoC sont : le collagène, la gélatine, la laminine et la fibronectine[230].

III.3.2. Les alternatives au PDMS

Le traitement du PDMS permet d'améliorer ses propriétés de surface et notamment d'augmenter son hydrophilie. Néanmoins, ceci implique des étapes et des coûts supplémentaires dans le procédé de fabrication des OoC. Pour y remédier, certains groupes de recherche essaient de trouver des matériaux alternatifs aux PDMS. Plusieurs types de matériaux sont étudiés notamment d'autres élastomères, des hydrogels, des polymères thermoplastiques, des résines, des papiers ou certains matériaux inorganiques[225]. Campbell *et al.*[225] ont publié en 2021 une revue bibliographique où ces différents matériaux alternatifs sont comparés entre eux et avec le PDMS[225].

III.4. Les procédés de fabrication des OoC/CoC

Pour la fabrication des OoC, ce sont généralement des approches par **moulage** (**replica moulding** en anglais) qui sont utilisées (Figure 1.19).

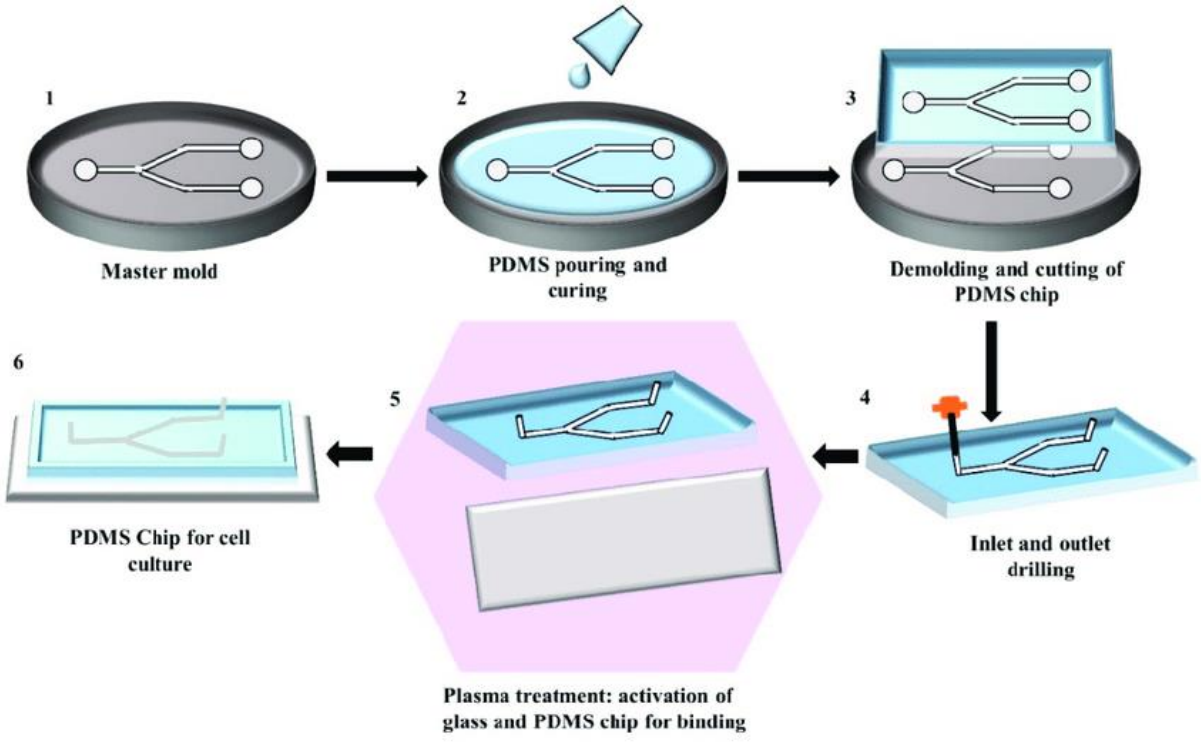


Figure 1.19. Etapes de fabrication d'un système microfluidique *via* un procédé de moulage[230].

Comme on peut le voir sur la Figure 1.19, la fabrication par moulage consiste à verser le mélange (PDMS – agent réticulant) sur un moule dont le motif est reproduit sur la couche de

PDMS après sa réticulation par traitement thermique. Cette technique de moulage fait partie des procédés de **lithographie douce** (ou **soft lithography** en anglais).

Les moules (aussi appelés **matrices** ou désigné par les termes anglais **tempates** ou **Master molds**) sont le plus souvent fabriqués par un procédé de **photolithographie** (ou **lithographie optique**) analogue à celui utilisé pour la fabrication des puces électroniques[231]. Ce procédé consiste à transférer un motif à un substrat *via* une exposition sélective à la lumière[231]. Il permet de fabriquer des moules avec une très grande résolution (micromètre voire nanomètres)[232]. Cependant, c'est aussi un procédé coûteux car il nécessite des équipements spécifiques et un personnel qualifié. Il doit par ailleurs être effectué en salle blanche[233].

III.5. Application de la technologie des CoC à la modélisation du cancer ovarien

Les exemples d'application des CoC à la modélisation du cancer ovarien ne sont pas très nombreux. On peut les classer en fonction de l'objectif principal de l'étude. Nous proposons de résumer cela dans le Tableau 1.10 ci-dessous.

Tableau 1.10. Application de la technologie des CoC à l'étude du cancer ovarien.

Domaine d'application	**Réf(s).**
Etudes des premières phases du développement du cancer ovarien	234,235
Etude des phénomènes de métastase	236,237
Modèles pour l'évaluation d'outils thérapeutiques pour la thérapie photodynamique contre le cancer ovarien	238
Etude des cellules souches cancéreuses et de leur rôle dans la chimiorésistance sous conditions de flux	239
Etude de l'extravasation des plaquettes depuis la circulation sanguine vers la masse tumorale et du rôle des cellules endothéliales dans ce processus	240
Etude de la relation entre les contraintes mécaniques associées à l'accumulation d'ascite dans la cavité abdominale et la physiopathologie du cancer ovarien	241

On remarque à travers ce tableau que la technologie OoC/CoC commence à être utilisée pour étudier **les problématiques clés associées au cancer ovarien**. Celles-ci incluent notamment :

- ✓ L'origine du cancer ovarien qui est toujours sujette à débat[26] ;

- ✓ Les phénomènes de métastase qui sont fortement associés au mauvais pronostic du cancer ovarien.

Les modèles de tumeurs ovariennes primaires destinés à l'évaluation d'agents thérapeutiques restent plutôt rares. Comme exemple, on peut citer l'article publié en 2020 par Flont *et al.*[238]. Les auteurs y ont décrit un modèle tumoral pour évaluer des agents photosensibilisants en vue d'applications en thérapie photodynamique. Pour ce faire, ils ont conçu et fabriqué un système microfluidique comprenant plusieurs chambres de culture (Figure 1.20). Le système a été fabriqué en PDMS et scellé avec une lame en verre. Une structure tumorale a été développée dans chaque chambre de culture. Chaque structure tumorale se composait de deux couches : (i) une couche stromale contenant des fibroblastes humains ovariens et (ii) une couche cancéreuse composée de cellules cancéreuses ovariennes A2780. Les fibroblastes ont été introduits en premier pour constituer une couche sur laquelle les cellules cancéreuses ont été ensemencées par la suite.

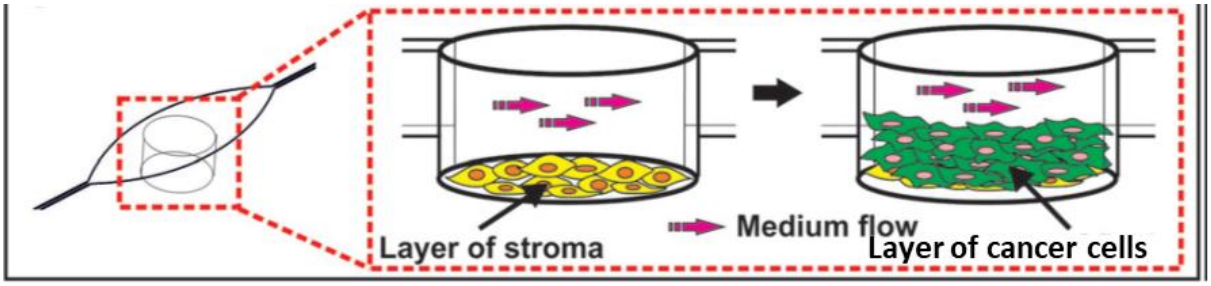


Figure 1.20 . Schéma du modèle décrit par Flont et al.[238]. Chaque structure tumorale se compose de deux couches : une couche de cellules stromales et une couche de cellules cancéreuse. Les chambres de culture sont soumises à un flux continu.

Les auteurs ont constaté que la présence des fibroblastes favorisait la prolifération des cellules cancéreuses. Le système décrit dans cette publication semble par ailleurs relativement facile d'utilisation. Il présente néanmoins quelques limites. D'abord, la structure tumorale décrite ne comprend pas d'éléments de la matrice extracellulaire. En effet, les cellules ont été introduites sous forme de suspension cellulaire directement dans la chambre de culture. On peut également souligner l'absence d'éléments vasculaires ou de cellules de l'immunité.

Ce modèle reste quand même un bon exemple de l'intérêt de la microfluidique pour la création de modèles tumoraux ovariens.

III.6. Autres exemples d'application de la technologie des CoC

Les exemples concernant le cancer ovarien étant peu nombreux, ils ne permettent pas de mesurer tout le potentiel de la technologie des CoC. Aussi nous avons fait le choix d'aborder des exemples concernant d'autres types cancéreux. Le but étant de donner au lecteur un aperçu un peu plus large de l'état de l'art par rapport à cette technologie. Toutefois, nous ne prétendons pas pouvoir être exhaustifs. En effet, les travaux décrivant des modèles de CoC sont très nombreux et très diversifiés. Ils peuvent être classés de deux façons :

- ✓ Soit en fonction du type de cancer étudié (cancer du poumon, du sein etc.) : Au cours de ce projet de thèse, nous avons rédigé une revue bibliographique adoptant cette classification[233] ;
- ✓ Ou en fonction du phénomène étudié (angiogenèse, métastase etc.). Ce mode de classification a notamment été adopté dans une revue publiée en 2019 par l'équipe du professeur Donald Ingber[220].

Par ailleurs les revues bibliographiques récentes traitant de ce sujet sont relativement nombreuses. On peut notamment citer les références suivantes[242–246].

Nous proposons dans le Tableau 1.11 un résumé des domaines d'applications de la technologie des CoC. Nous y avons combiné les deux modalités de classification citées ci-dessus. Le but étant de permettre au lecteur d'identifier rapidement les références qui lui seront utiles. Il faut garder à l'esprit que plusieurs applications différentes peuvent être abordées dans une même publication. Pour établir notre classification, nous nous sommes donc basés sur l'objectif principal mis en avant par les auteurs dans chaque article. A noter également que certains travaux abordent plusieurs types cancéreux en même temps.

Tableau 1.11. Exemples des domaines d'application de la technologie des CoC.

Champs d'application	**Type de cancer étudié**	**Réf(s).**
Etude des premières phases du développement cancéreux (passage de lésions précancéreuses à des lésions cancéreuses).	Cancer du sien	[247]
Création de modèles de la tumeur primaire pour étudier les interactions entre les cellules cancéreuses	Cancer du poumon	[248]
	Cancer de la prostate	[249]

et les autres éléments du TME (CAFs ; éléments vasculaires ; système immunitaire etc.) en explorant le rôle de certains aspects dynamiques dans ces interactions. Ces travaux donnent généralement des « preuves de concept » à travers l'évaluation de l'activité de molécules thérapeutiques.	Cancer du sein	250–253
	Cancer colorectal	6,252
	Cancer du pancréas	254–257
	Cancer de la vessie	258
Etude du phénomène d'angiogenèse et des interactions entre les cellules cancéreuses et les éléments vasculaires.	Cancer du sien	259
	Cancer du pancréas	260
	Glioblastome	261
	Cancer du foie	261
	Cancer du rein	262
Etude des phénomènes de **migration** des cellules cancéreuses et des **processus de métastase** (rôle des acteurs du TME ; présence d'une prédilection vers des tissus spécifiques ; rôle de l'hypoxie ; rôle des éléments vasculaires ; rôle des éléments du système immunitaire etc.).	Cancer du poumon	263–269
	Cancer de la prostate	270
	Cancer du sein	271–276
	Cancer colorectal	277–279
	Cancer du rein	280
Evaluation de l'activité d'outils thérapeutiques (étude précliniques, approches de médecine de précision etc.)	Cancer du sein	281–284
	Cancer de la prostate	283
	Cancer colorectal	285–287
Etude du passage de nanoparticules à visée thérapeutique à travers la barrière hémato-encéphalique	Glioblastome	288

A travers l'analyse de ce tableau, on peut remarquer la diversité des travaux faisant appel à la technologie des CoC. Par ailleurs, les tendances suivantes peuvent être soulignées :

- ✓ Les cancers du sein et du poumon semblent être les plus souvent étudiés *via* l'approche des CoC. Ceci s'explique en partie par l'importance épidémiologique de ces deux types cancéreux et le grand nombre d'équipes qui travaillent dessus. Mais ce n'est évidemment pas la seule raison. La technologie des CoC est en effet très utile

pour modéliser l'interface air – liquide au niveau pulmonaire et l'interface épithélium – stroma au niveau de la glande mammaire ;

- ✓ La technologie des CoC semble être très souvent employée pour étudier les phénomènes de métastase. Elle se prête particulièrement bien à cette application grâce à la possibilité de créer plusieurs compartiments en les connectant par un système circulatoire.

En plus des applications mentionnées dans le Tableau 1.11, la microfluidique est également de plus en plus utilisée pour mettre au point ou améliorer des techniques de pronostic ou de diagnostic du cancer. L'isolement de cellules cancéreuses circulantes est un exemple récurrent de cette application[289–291].

Après avoir discuté les champs d'application des CoC de manière générale, nous proposons dans le Tableau 1.12 ci-dessous une analyse détaillée de certains exemples récents (2020 – 2023) où des CoC ont été utilisés pour évaluer des molécules thérapeutiques. Ceci permettra au lecteur de mieux comprendre comment ces outils sont conçus et utilisés. Nous allons par ailleurs discuter les avantages et les limites de chacun des exemples mentionnés.

La sélection de ces exemples ne s'est pas faite par rapport au type cancéreux étudié. Nous avons jugé plus pertinent d'aborder plus généralement les publications les plus récentes (2020 – 2023) décrivant des modèles évolués ou innovants. Le but étant comme à chaque fois de donner le meilleur aperçu possible de l'état de l'art même si, là encore, nous ne prétendons pas pouvoir être exhaustifs.

Tableau 1.12. Analyse d'exemples d'utilisation des CoC dans l'évaluation d'outils thérapeutiques.

Réf. / Année	Description et but global de l'étude	Description du design utilisé	Matériaux, procédés de fabrication et cellules utilisées	Résultats, discussion et limites du modèle proposé
[285] / 2020	L'idée principale à travers cette publication était de soumettre des cellules cancéreuses à une	Le système se composait d'une chambre de culture (compartiment inférieur) et d'un canal	Les 2 parties du système ont été fabriquées en PDMS *via* une méthode de moulage. Le système a été scellé avec une lame en verre. La	Le profil de croissance des cellules exposées à une concentration dynamique de médicament a été différent de celui observé pour une concentration

	concentration « **dynamique** » d'agents thérapeutiques. Autrement dit, une concentration qui évolue en fonction du temps selon un profil comparable à celui observé *in vivo*. Ceci a été effectué en utilisant un dispositif microfluidique.	d'alimentation en médicament (Compartiment supérieur) où la concentration d'agent thérapeutique pouvait être modulée en fonction du temps. Les deux compartiments étaient séparés par une membrane microporeuse. Dans la chambre de culture, les cellules ont été cultivées en monocouche (2D)	membrane séparant les 2 compartiments est une membrane en polytétrafluoréthylène (PTFE) de 35 µm d'épaisseur. Les cellules utilisées sont des cellules HCT-116 (cellules de cancer colorectal).	inchangée sur la même période de temps. Même si ce résultat est attendu, il démontre l'importance de prendre en compte les variations de concentrations de médicaments observées *in vivo* dans les modèles précliniques. Pour ce faire, la microfluidique est une approche intéressante. Donc le point fort clé de cette publication est l'idée de « concentration dynamique » qui est généralement peu étudiée via l'approche CoC. Par contre, le système CoC décrit ici présente aussi des limites évidentes. La composante « biologique » dans ce modèle manque beaucoup de complexité (pas d'éléments du TME, pas d'environnement 3D). Ce modèle n'offre pas non plus la possibilité de screening à haut débit. Pour résumer, l'idée est innovante mais le modèle est largement perfectible.
[286] / 2021	Cette publication décrit une version améliorée de l'exemple précédent. Ici ce sont des	Le système utilisé ici comprenait un canal microfluidique et 8 chambres de culture destinées à	Les chercheurs ont utilisé une puce commercialisée par Ibidi. Les matériaux composant la puce ne sont pas indiqués. Les auteurs spécifient	Les sphéroïdes soumis à une concentration constante de médicament (conditions statiques) ont montré plus de sensibilité au traitement par rapport aux sphéroïdes soumis à

	sphéroïdes cancéreux qui ont été exposés à des concentrations dynamiques d'agents thérapeutiques *via* un système microfluidique. Cette étude a été conduite par une équipe R&D d'AstraZeneca.	accueillir les sphéroïdes. Plusieurs réservoirs permettaient de contrôler la concentration du médicament en fonction du temps.	néanmoins qu'il s'agit d'une puce « sans PDMS » pour éviter les problèmes d'adsorption de principes actifs. Pour la composante biologique, les auteurs ont utilisé des sphéroïdes de cellules SW620 (cellules de cancer colorectal). Après leur formation, les sphéroïdes ont été incorporés dans une matrice en Matrigel® pour reproduire l'ECM tumorale.	une concentration dynamique (dans le système microfluidique). Par ailleurs, les réponses des sphéroïdes observées dans ce système ont pu être reproduites *in vivo*. Ceci constitue un argument en faveur de la prédictivité de ce modèle. Ce modèle présente en effet quelques avantages par rapport à celui décrit dans l'exemple précédent. Ceux-ci incluent le recours à une méthode de culture cellulaire en 3D ; la présence d'éléments de l'ECM et la possibilité de cultiver 8 sphéroïdes en même temps. Cependant les structures tumorales sont là encore constituées uniquement de cellules cancéreuses. On peut donc souligner l'absence d'acteurs clés qui modifient la réponse thérapeutique tels que les CAFs ou les structures vasculaires.
[6] / 2021	Dans cette étude, Les auteurs ont décrit un modèle vascularisé du cancer colorectal. Ce modèle comprenait plusieurs	Le dispositif développé ici se composait de 12 unités microfluidiques indépendantes. Chacune comprenant 3 chambres de culture (Figure 1.21). Un	Le dispositif microfluidique a été fabriqué en PDMS via un procédé de moulage. Un moule en polyuréthane a été fabriqué au préalable. Pour la composante biologique, les	Le réseau vasculaire formé par les cellules endothéliales dans le système microfluidique présentait des caractéristiques de la vascularisation tumorale observée *in vivo* (irrégulière et ayant une

	compartiments tumoraux et un réseau vasculaire fonctionnel. Il a été validé à travers l'évaluation de plusieurs molécules thérapeutiques utilisées en clinique.	mélange de cellules cancéreuses, fibroblastes et cellules endothéliales dans une solution de fibrinogène a été préparé, mélangé à une solution de thrombine puis rapidement injecté dans chaque unité microfluidique. La matrice de fibrine ainsi obtenue a permis l'auto-organisation des 3 types cellulaires dans chaque chambre microfluidique.	cellules suivantes ont été utilisées : (i) des cellules cancéreuses du cancer colorectal (HCT-116 ou SW480, un seul type à la fois) ; (ii) des cellules endothéliales (ECFC-EC) et (iii) des fibroblastes humains normaux (NHLF).	perméabilité anormalement élevée). Les cellules cancéreuses cultivées dans le système ont révélé un profil transcriptomique analogue à celui observé dans des xénogreffes. Or cette similitude a été moins présente en 2D et en modèles 3D statiques (sphéroïdes). Ce système microfluidique a également été utilisé pour évaluer des outils thérapeutiques visant le TME ce qui n'aurait pas été possible en monocultures 2D ou 3D. Effectivement, le modèle décrit ici est particulièrement intéressant parce qu'il associe deux avantages clés : (i) Un bon niveau de complexité biologique (3 types cellulaires différents et un réseau vasculaire fonctionnel) et (ii) La présence de plusieurs unités indépendantes permettant une évaluation simultanée de plusieurs molécules thérapeutiques ou plusieurs concentrations différentes. Cependant, des limites restent bien entendu à souligner. On peut par exemple évoquer

				l'absence des cellules de l'immunité dans ce modèle. Par ailleurs, le réseau vasculaire développé est très réduit et ne permet pas de simuler le parcours vasculaire complet de la molécule médicamenteuse. Ce modèle reste néanmoins un très bon exemple pour illustrer le potentiel de la technologie des organes sur puce.

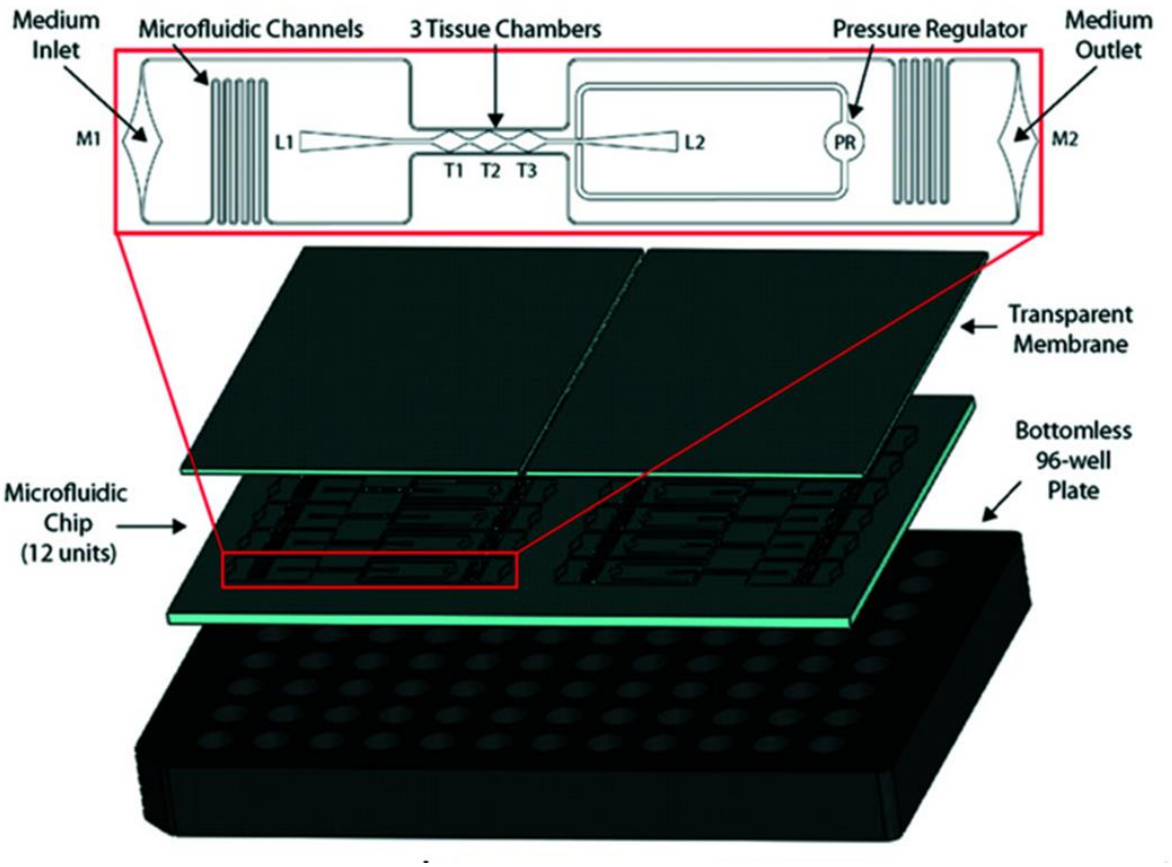


Figure 1.21. Le modèle développé par Hachey *et al*.[6]. Celui-ci comprenait 12 unités microfluidique. Chacune d'elles comptait 3 chambres de culture (T1, T2 et T3). Une entrée d'alimentation en milieu (M1) était connectée à chaque unité. Les cellules étaient introduites via l'entrée L1.

[283] / 2022	Dans cette étude, l'idée était de mettre en culture des tissus issus de xénogreffes tumorales de patients (patient-derived xenografts ou **PDX** en anglais) dans un système microfluidique. Les modèles ainsi obtenus ont été utilisés pour évaluer	Le système microfluidique utilisé comprenait 6 chambres de culture indépendantes. Chaque chambre était alimentée par un flux bidirectionnel de milieu de culture (un flux inférieur et un flux supérieur). Le but étant d'assurer un	Le système comprenait une partie interne fabriquée en PDMS et une partie externe (support) fabriquée en silicone. Les tissus intégrés dans le système microfluidique ont été obtenus à partir de PDX. Ces xénogreffes ont été découpées en tranches de 300 µm d'épaisseur avant de les mettre en culture. Les PDX	Après une mise en culture de 14 jours, les tissus cancéreux dans le système microfluidique (conditions dynamiques) ont mieux conservé leur morphologie et ont maintenu une plus grande viabilité par rapport aux tissus cultivés dans des plaques 24 puits (conditions statiques). Le profil de sensibilité/résistance à la chimiothérapie des tissus tumoraux observé dans le système microfluidique était similaire à celui

	l'activité de molécules thérapeutiques.	apport suffisant et homogène en nutriments pour les tissus.	utilisées correspondaient à des cancers du sein et de la prostate.	observé *in vivo* ce qui semble indiquer le potentiel prédictif de ce modèle. Par ailleurs, le système développé dans cette publication présente des aspects « techniques » très intéressants. On peut notamment souligner l'intérêt d'avoir 6 unités totalement indépendantes ce qui permet de mener plusieurs expériences en parallèle. Néanmoins, d'autres aspects doivent être discutés. D'abord, le choix d'avoir utilisé des PDX présente à la fois des avantages mais aussi des limites. Les tissus issus de PDX présentent un haut niveau de complexité biologique (cellules stromales, ECM). Mais les PDX nécessitent l'usage d'animaux et sont longs et coûteux à mettre en place. On peut néanmoins envisager l'usage de ce système avec des tissus cancéreux humains ou des organoïdes. La 2ème limite à souligner est le manque d'éléments vasculaires et immunitaires même si des cellules immunitaires d'origine animale

				peuvent persister dans les PDX. Ce modèle offre quand même une bonne combinaison entre un niveau suffisant de complexité biologique et une capacité d'effectuer simultanément plusieurs expériences.

L'analyse de ces exemples nous permet de faire les quelques commentaires suivants concernant les défis auxquels doit encore faire face la technologie OoC/CoC :

- ✓ Il reste difficile d'associer, au sien d'un système, **un niveau suffisant de complexité biologique** et **la capacité de tester simultanément plusieurs conditions (plusieurs concentrations de médicament ou plusieurs molécules différentes)**. Très souvent, la composante biologique reste très simple par rapport à la complexité observée *in vivo*. Néanmoins, certains travaux semblent réussir à associer ces deux aspects au sein d'un même modèle (voir les exemple correspondant aux références [6] et [283] au Tableau 1.12 ci-dessus). Pour ces systèmes, c'est alors un autre problème qui va se poser. ils atteignent un tel niveau de complexité qu'il devient **difficile d'envisager leur utilisation en pratique courante (que ce soit en recherche académique ou en industrie)**. C'est d'ailleurs en partie pour ça que la technologie des OoC et des CoC est encore globalement au stade de « preuve de concept » et qu'elle tarde à s'imposer dans l'usage courant en recherche et développement en industrie pharmaceutique. **Associer complexité biologique, efficacité et faciliter d'utilisation reste donc un défi important à relever pour cette technologie** ;
- ✓ Certains modèles de CoC incluent des éléments vasculaires et parviennent même à reconstituer des réseaux vasculaires fonctionnels. Néanmoins, la vascularisation simulée dans ces modèles est généralement celle **se trouvant au voisinage immédiat de la tumeur**. Or, ceci ne permet pas d'étudier **le parcours vasculaire du médicament avant son interaction avec le tissu cible (le tissu tumoral)**. On sait par ailleurs que cette phase de transport vasculaire est très importante à prendre pour en compte pour

certains agents thérapeutiques et notamment pour les agents nanoparticulaires. En effet, au cours de leur trajet vasculaire, les nanoparticules thérapeutiques peuvent adsorber des protéines plasmatiques pour s'entourer d'une « couronne de protéines ». Cette couronne protéique peut modifier ou affecter leur action thérapeutique (masquage des ligands de ciblage, modification des interactions avec les cellules de l'immunité etc.)[292,293]. Il est donc très important d'inclure cet aspect dans les nouvelles générations de CoC, notamment ceux destinés à l'évaluation d'agents nanoparticulaires ;

- ✓ On peut également remarquer la grande diversité des travaux faisant appel à le technologie OoC/CoC. Pour faciliter la généralisation industrielle de cette technologie, un grand effort de règlementation, de synchronisation et de standardisation semble donc nécessaire. Une coordination des efforts entre le monde académique et le monde de l'industrie pharmaceutique permettrait aussi probablement de mieux tirer profit de cette technologie.

III.7. Les systèmes microfluidiques générateurs de gradients

Comme nous l'avons mentionné dans le paragraphe précédent, il est très important de développer des CoC capables de tester, en même temps de tester, en même temps, plusieurs concentrations différentes de xénobiotique. L'une des options possibles pour répondre à cette problématique est l'utilisation des systèmes microfluidiques générateurs de gradients. De tels dispositifs ont en effet été décrits dans la littérature dès le début des années 2000. Généralement, ils permettent de créer un gradient de concentration en mélangeant une solution et ou son solvant sur plusieurs étages successifs. C'est le cas du dispositif décrit en 2000 par Jeon *et al*.[294]. Un schéma de celui-ci est illustré par la Figure 1.22 ci-dessous. Dans cette étude, les chercheurs n'ont pas exploré d'éventuelles applications biologiques de leur système.

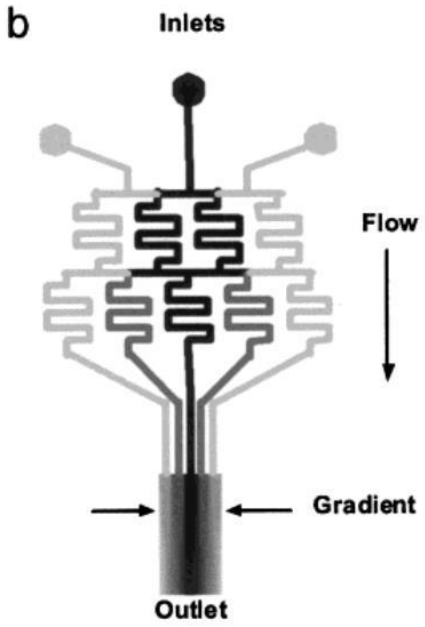


Figure 1.22 . Schéma du dispositif développé en 2000 par Jeon et al[294]. Le mélange s'effectue sur plusieurs étages successifs.

Un dispositif basé sur un principe de fonctionnement similaire (création de gradient en plusieurs étages) a été décrit en 2006 par Irimia *et al*.[295]. Celui-ci permettait de générer un gradient de concentration à partir de deux solutions initiales. Ce système pouvait être utilisé pour établir différents types de gradients et les maintenir dans le temps. Dans ce travail, les auteurs ont apporté la preuve mathématique et expérimentale du fonctionnement de leur système. Néanmoins, ils n'ont pas donné de preuve de concept par rapport à ses potentielles applications biologiques. En 2018, Orcheston-Findlay *et al*.[296] ont utilisé un système microfluidique pour exposer des cellules cancéreuses à un gradient d'oxygène reproduisant différentes conditions retrouvées *in vivo*. Ces systèmes ont donc bien leur place dans la modélisation et l'étude des pathologies cancéreuses. Cependant à l'heure actuelle et à notre connaissance, il existe très peu (voire pas) d'exemples utilisant les systèmes générateurs de gradient pour cultiver des modèles tumoraux 3D multicellulaires complexes et tester des xénobiotiques dessus. Par ailleurs et comme nous l'avons vu ci-dessus, la plupart des systèmes microfluidiques générateurs de gradients décrits actuellement dans la littérature fonctionnent en plusieurs étages successifs. Or ceci donne des designs trop complexes pour envisager une application à grande échelle. Un système générant un gradient sur un seul étage semble être plus approprié pour la modélisation de tumeurs cancéreuses.

C'est face à ce contexte que nous avons entrepris, dans ce projet de thèse, de développer un système permettant la génération d'un gradient de concentration *via* un mélangeur unique et sans recourir à plusieurs étages de mélange. Pour ce faire, nous avons eu recours à la simulation en mécanique des fluides comme nous allons le voir dans le 4ème chapitre de ce manuscrit.

IV. Conclusions du volet bibliographique

Ce paragraphe répond à un double objectif. D'abord, il vise à rappeler et à synthétiser les conclusions issues de notre analyse bibliographique. Ensuite, il établit un lien entre ces conclusions et les objectifs de cette thèse.

Les principales conclusions de notre étude bibliographique peuvent être présentées **très brièvement** de la manière suivante :

- ✓ La culture cellulaire en 2D est simple à mettre en place et peu coûteuse. Cependant, elle est loin de pourvoir reproduire la complexité des structures tumorales ;
- ✓ Les approches (sphéroïdes – organoïdes) présentent chacune des avantages certains. Néanmoins, elles se heurtent à des problèmes de reproductibilité (sphéroïdes) et de coût et de taux de succès (organoïdes) ;
- ✓ La bio-impression 3D semble être une approche de culture cellulaire 3D prometteuse grâce au recours à la conception assistée par ordinateur. Cette technologie a été utilisée pour modéliser de nombreux types cancéreux. Cependant, elle a encore très peu été appliquée au cancer ovarien ;
- ✓ La technologie microfluidique promet de révolutionner les modèles tumoraux *via* les approches OoC/CoC. Mais là encore, ces approches ont été peu utilisées pour étudier le cancer ovarien ;
- ✓ On remarque par ailleurs que les modèles de CoC développés à l'heure actuelle ne permettent pas de simuler en même temps **le trajet vasculaire de la molécule thérapeutique** et **son interaction avec le tissu tumoral**. Or ceci est très important surtout pour développer des outils thérapeutiques nanoparticulaires ;

- ✓ Enfin, nous pouvons également souligner la nécessité de la collaboration (recherche – industrie) pour accélérer le transfert industriel de la technologie des OoC/CoC.

De façon générale, nous pouvons donc tirer la conclusion suivante. L'état de l'art en matière de nouveaux modèles tumoraux a considérablement progressé ces dernières années. Cependant, il reste encore de nombreuses perspectives de recherche à explorer.

A travers ce projet de thèse, nous avons tenté d'apporter une contribution à l'état de l'art en traitant certains aspects encore peu couverts par la bibliographie. Ce projet a été mené au sein de l'Institut Jean Lamour à Nancy. Son but premier était de mettre à profit les technologies de culture cellulaire en 3D et de microfluidique pour construire un modèle tumoral destiné à évaluer l'activité de **nanoparticules anticancéreuses développées par notre équipe**. Mais il visait aussi à améliorer les modèles tumoraux existants du cancer ovarien.

Nous avons donc organisé ce projet autour **de deux axes principaux** :

1. Créer un modèle 3D d'une tumeur ovarienne épithéliale :

Pour ce faire, nous avons opté pour l'**approche de bio-impression 3D**. Nous avons sélectionné cette technologie pour deux raisons principales :

- ✓ Elle offre une grande flexibilité de design tout en assurant une bonne reproductibilité. Ceci la rendait très adéquate pour ce projet où nous avions besoin de bien contrôler les dimensions de notre modèle tumoral ;
- ✓ Ce choix est en concordance avec notre étude bibliographique. En effet, la bio-impression 3D a très peu été utilisée pour modéliser des tumeurs ovariennes. C'était donc pour nous l'occasion d'apporter une contribution innovante à l'état de l'art.

Les travaux relatifs à l'établissement et à la caractérisation du modèle tumoral bio-imprimé seront abordés dans le 3ème chapitre de ce manuscrit. Dans le 4ème chapitre, et pour approfondir la caractérisation de ce modèle, nous allons étudier son comportement vis-à-vis du cisplatine (médicament commun dans le traitement du cancer ovarien).

2. Développer un système microfluidique permettant la mise en culture de notre modèle de tumeur ovarienne :

A travers le développement de ce système microfluidique, nous avons voulu atteindre 3 objectifs en adéquation avec notre étude bibliographique :

- ✓ Maintenir le modèle tumoral en culture sous flux physiologique permanant. Le but étant la prise en compte de certaines des conditions dynamiques du TME ;
- ✓ Simuler, dans un même système, le trajet vasculaire de la molécule thérapeutique et son interaction avec le tissu cible ;
- ✓ Pouvoir évaluer en même temps plusieurs concentrations d'agents thérapeutiques.

Cette partie « microfluidique » sera traitée dans le 5ème chapitre de ce manuscrit.

Avant de découvrir tout cela, nous allons maintenant aborder les aspects méthodologiques dans le second chapitre.

Références bibliographiques

1. World Health Organization (WHO). Cancer. Accessed June 20, 2023. https://www.who.int/fr/health-topics/cancer

2. World Health Organization (WHO). Cancer key facts. Accessed January 10, 2023. https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer

3. Baudino TA. Targeted Cancer Therapy: The Next Generation of Cancer Treatment. *Curr Drug Discov Technol*. 2015;12(1):3-20. doi:10.2174/1570163812666150602144310

4. Borgers JSW, Heimovaara JH, Cardonick E, et al. Immunotherapy for cancer treatment during pregnancy. *The Lancet Oncology*. 2021;22(12):e550-e561. doi:10.1016/S1470-2045(21)00525-8

5. Maeda H, Khatami M. Analyses of repeated failures in cancer therapy for solid tumors: poor tumor-selective drug delivery, low therapeutic efficacy and unsustainable costs. *Clin Transl Med*. 2018;7. doi:10.1186/s40169-018-0185-6

6. Hachey SJ, Movsesyan S, Nguyen QH, 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;21(7):1333-1351. doi:10.1039/d0lc01216e

7. Neufeld L, Yeini E, Reisman N, et al. Microengineered perfusable 3D-bioprinted glioblastoma model for in vivo mimicry of tumor microenvironment. *Sci Adv*. 2021;7(34):eabi9119. doi:10.1126/sciadv.abi9119

8. Germain N, Dhayer M, Dekiouk S, Marchetti P. Current Advances in 3D Bioprinting for Cancer Modeling and Personalized Medicine. *Int J Mol Sci*. 2022;23(7):3432. doi:10.3390/ijms23073432

9. Sharma R, Perez MR, Silva VA da, et al. 3D bioprinting complex models of cancer. *Biomater Sci*. 2023;11(10):3414-3430. doi:10.1039/D2BM02060B

10. Tan B, Gan S, Wang X, Liu W, Li X. Applications of 3D bioprinting in tissue engineering: advantages, deficiencies, improvements, and future perspectives. *J Mater Chem B*. 2021;9(27):5385-5413. doi:10.1039/D1TB00172H

11. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*. 2021;71(3):209-249. doi:https://doi.org/10.3322/caac.21660

12. International Agency for Research on Cancer (IARC), World Health Organization (WHO). Cancer today. CANCER TODAY (International Agency For Research on Cancer. Accessed January 7, 2022. http://gco.iarc.fr/today/home

13. Ovarian Cancer : Key stats. World Ovarian Cancer Coalition. Accessed January 7, 2022. https://worldovariancancercoalition.org/about-ovarian-cancer/key-stats/

14. Momenimovahed Z, Tiznobaik A, Taheri S, Salehiniya H. Ovarian cancer in the world: epidemiology and risk factors. *Int J Womens Health*. 2019;11:287-299. doi:10.2147/IJWH.S197604

15. Kurosaki A, Hasegawa K, Kato T, et al. Serum folate receptor alpha as a biomarker for ovarian cancer: Implications for diagnosis, prognosis and predicting its local tumor expression. *International Journal of Cancer*. 2016;138(8):1994-2002. doi:10.1002/ijc.29937

16. Menon U, Gentry-Maharaj A, Burnell M, et al. Ovarian cancer population screening and mortality after long-term follow-up in the UK Collaborative Trial of Ovarian Cancer Screening (UKCTOCS): a randomised controlled trial. *The Lancet*. 2021;397(10290):2182-2193. doi:10.1016/S0140-6736(21)00731-5

17. Lisio MA, Fu L, Goyeneche A, Gao Z hua, Telleria C. High-Grade Serous Ovarian Cancer: Basic Sciences, Clinical and Therapeutic Standpoints. *Int J Mol Sci*. 2019;20(4):952. doi:10.3390/ijms20040952

18. Vaughan S, Coward JI, Bast Jr. RC, et al. Rethinking Ovarian Cancer: Recommendations for Improving Outcomes. *Nat Rev Cancer*. 2011;11(10):719-725. doi:10.1038/nrc3144

19. Trétarre B, Remontet L, Ménégoz F, et al. Les cancers de l'ovaire : incidence et mortalité en France. *Journal de Gynécologie Obstétrique et Biologie de la Reproduction*. 2005;34(2):154-161. doi:10.1016/S0368-2315(05)82707-3

20. Trétarre B, Mounier M, Arveux P, Lecoffre C, Lafay L, Coureau CG. Survie des personnes atteintes de cancer en France métropolitaine 1989-2018 - Ovaire. *Institut National du Cancer*. Published online 2020:10.

21. Cancer du sein. Santé Public France. Published July 13, 2021. Accessed January 6, 2022. https://www.santepubliquefrance.fr/maladies-et-traumatismes/cancers/cancer-du-sein

22. Lengyel E. Ovarian Cancer Development and Metastasis. *Am J Pathol*. 2010;177(3):1053-1064. doi:10.2353/ajpath.2010.100105

23. Soriano AA, de Cristofaro T, Di Palma T, et al. PAX8 expression in high-grade serous ovarian cancer positively regulates attachment to ECM via Integrin β3. *Cancer Cell Int*. 2019;19. doi:10.1186/s12935-019-1022-8

24. Karnezis AN, Cho KR, Gilks CB, Pearce CL, Huntsman DG. The disparate origins of ovarian cancers: pathogenesis and prevention strategies. *Nat Rev Cancer*. 2017;17(1):65-74. doi:10.1038/nrc.2016.113

25. Carcopino X, Levêque J, Riethmuller D, Henno, S, Duvillard P. *Cancers gynécologiques pelviens*. Elsevier Health Sciences France.; 2013. Accessed September 15, 2020. http://www.sciencedirect.com/science/book/9782294729379

26. Kim J, Park EY, Kim O, et al. Cell Origins of High-Grade Serous Ovarian Cancer. *Cancers (Basel)*. 2018;10(11):433. doi:10.3390/cancers10110433

27. Chêne G, Dauplat J, Radosevic-Robin N, Cayre A, Penault-Llorca F. The Fallopian tube odyssey: from the ovary to the tube. About high-grade serous ovarian carcinoma. *Bulletin du Cancer*. 2013;100(7-8):757-764. doi:10.1684/bdc.2013.1785

28. Kurman RJ, Hedrick Ellenson L, Ronnett BM, eds. *Blaustein's Pathology of the Female Genital Tract*. 7th ed. Springer International Publishing; 2019. doi:10.1007/978-3-319-46334-6

29. Matulonis UA, Sood AK, Fallowfield L, Howitt BE, Sehouli J, Karlan BY. Ovarian cancer. *Nat Rev Dis Primers*. 2016;2(1):1-22. doi:10.1038/nrdp.2016.61

30. Penet MF, Krishnamachary B, Wildes FB, et al. Ascites Volumes and the Ovarian Cancer Microenvironment. *Frontiers in Oncology*. 2018;8. Accessed February 9, 2022. https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fonc.2018.00595

31. RJ K, ML C, CS H, RH Y. *WHO Classification of Tumours of Female Reproductive Organs*. 4 th. WHO; 2014. Accessed February 9, 2022. https://publications.iarc.fr/Book-And-Report-Series/Who-Classification-Of-Tumours/WHO-Classification-Of-Tumours-Of-Female-Reproductive-Organs-2014

32. Shih IM, Kurman RJ. Ovarian Tumorigenesis. *Am J Pathol*. 2004;164(5):1511-1518.

33. Fulawka L, Halon A. Proliferation Index Evaluation in Breast Cancer Using ImageJ and ImmunoRatio Applications. *Anticancer Res*. 2016;36(8):3965-3972.

34. Mahadevappa A, Krishna SM, Vimala MG. Diagnostic and Prognostic Significance of Ki-67 Immunohistochemical Expression in Surface Epithelial Ovarian Carcinoma. *J Clin Diagn Res*. 2017;11(2):EC08-EC12. doi:10.7860/JCDR/2017/24350.9381

35. Manu V, Hein TA, Boruah D, Srinivas V. Serous ovarian tumors: Immunohistochemical profiling as an aid to grading and understanding tumorigenesis. *Med J Armed Forces India*. 2020;76(1):30-36. doi:10.1016/j.mjafi.2018.06.014

36. O'Neill CJ, McBride HA, Connolly LE, Deavers MT, Malpica A, McCluggage WG. High-grade ovarian serous carcinoma exhibits significantly higher p16 expression than low-grade serous carcinoma and serous borderline tumour. *Histopathology*. 2007;50(6):773-779. doi:10.1111/j.1365-2559.2007.02682.x

37. Kato N, Sasou S ichi, Motoyama T. Expression of hepatocyte nuclear factor-1beta (HNF-1beta) in clear cell tumors and endometriosis of the ovary. *Mod Pathol*. 2006;19(1):83-89. doi:10.1038/modpathol.3800492

38. Liliac L, Carcangiu ML, Canevari S. The value of PAX8 and WT1 molecules in ovarian cancer diagnosis. *Rom J Morphol Embryol*. 2013;54(1):17-27.

39. Mahmood RD, Morgan RD, Edmondson RJ, Clamp AR, Jayson GC. First-Line Management of Advanced High-Grade Serous Ovarian Cancer. *Curr Oncol Rep*. 2020;22(6):64. doi:10.1007/s11912-020-00933-8

40. Kapałczyńska M, Kolenda T, Przybyła W, et al. 2D and 3D cell cultures – a comparison of different types of cancer cell cultures. *Arch Med Sci*. 2018;14(4):910-919. doi:10.5114/aoms.2016.63743

41. Antoni D, Burckel H, Josset E, Noel G. Three-Dimensional Cell Culture: A Breakthrough in Vivo. *Int J Mol Sci*. 2015;16(3):5517-5527. doi:10.3390/ijms16035517

42. Edmondson R, Broglie JJ, Adcock AF, Yang L. Three-Dimensional Cell Culture Systems and Their Applications in Drug Discovery and Cell-Based Biosensors. *Assay Drug Dev Technol*. 2014;12(4):207-218. doi:10.1089/adt.2014.573

43. Rodríguez-Hernández CO, Torres-García S, Olvera-Sandoval C, et al. Cell Culture: History, Development and Prospects. *International Journal of Current Research and Academic Review*. Published online 2014:188-200.

44. Jedrzejczak-Silicka M. History of Cell Culture. In: Gowder SJT, ed. *New Insights into Cell Culture Technology*. InTech; 2017. doi:10.5772/66905

45. Witkowski JA. Dr. Carrel's immortal cells. *Med Hist*. 1980;24(2):129-142.

46. Carrel A. PURE CULTURES OF CELLS. *J Exp Med*. 1912;16(2):165-168. doi:10.1084/jem.16.2.165

47. Weksler ME. Les rues de Paris : « L'affaire Alexis Carrel ». *Med Sci (Paris)*. 2004;20(6-7):707-709. doi:10.1051/medsci/2004206-7707

48. Rensberger B. *Au cœur de la vie: Au royaume de la cellule vivante*. De Boeck Supérieur; 1999.

49. Lucey BP, Nelson-Rees WA, Hutchins GM. Henrietta Lacks, HeLa cells, and cell culture contamination. *Arch Pathol Lab Med*. 2009;133(9):1463-1467. doi:10.5858/133.9.1463

50. Ravi M, Paramesh V, Kaviya SR, Anuradha E, Solomon FDP. 3D Cell Culture Systems: Advantages and Applications. *Journal of Cellular Physiology*. 2015;230(1):16-26. doi:https://doi.org/10.1002/jcp.24683

51. Breslin S, O'Driscoll L. Three-dimensional cell culture: the missing link in drug discovery. *Drug Discov Today*. 2013;18(5-6):240-249. doi:10.1016/j.drudis.2012.10.003

52. Ballav S, Deshmukh AJ, Siddiqui S, Aich J, Basu S. *Two-Dimensional and Three-Dimensional Cell Culture and Their Applications*. IntechOpen; 2021. doi:10.5772/intechopen.100382

53. Barbosa MAG, Xavier CPR, Pereira RF, Petrikaitė V, Vasconcelos MH. 3D Cell Culture Models as Recapitulators of the Tumor Microenvironment for the Screening of Anti-Cancer Drugs. *Cancers (Basel)*. 2021;14(1):190. doi:10.3390/cancers14010190

54. Baker BM, Chen CS. Deconstructing the third dimension – how 3D culture microenvironments alter cellular cues. *J Cell Sci*. 2012;125(13):3015-3024. doi:10.1242/jcs.079509

55. Abbott A. Biology's new dimension. *Nature*. 2003;424(6951):870-872. doi:10.1038/424870a

56. Martin J. Seeing the full picture: advances in 3D cell culture microscopy. *BioTechniques*. 2020;69(2):77-79. doi:10.2144/btn-2020-0094

57. Maritan SM, Lian EY, Mulligan LM. An Efficient and Flexible Cell Aggregation Method for 3D Spheroid Production. *J Vis Exp*. 2017;(121):55544. doi:10.3791/55544

58. Vadivelu RK, Kamble H, Shiddiky MJA, Nguyen NT. Microfluidic Technology for the Generation of Cell Spheroids and Their Applications. *Micromachines (Basel)*. 2017;8(4). doi:10.3390/mi8040094

59. de Hoogt R, Estrada MF, Vidic S, et al. Protocols and characterization data for 2D, 3D, and slice-based tumor models from the PREDECT project. *Sci Data*. 2017;4(1):170170. doi:10.1038/sdata.2017.170

60. Cukierman E, Pankov R, Stevens DR, Yamada KM. Taking Cell-Matrix Adhesions to the Third Dimension. *Science*. 2001;294(5547):1708-1712. doi:10.1126/science.1064829

61. Nath S, Devi GR. Three-Dimensional Culture Systems in Cancer Research: Focus on Tumor Spheroid Model. *Pharmacol Ther*. 2016;163:94-108. doi:10.1016/j.pharmthera.2016.03.013

62. Ghoneum A, Afify H, Salih Z, Kelly M, Said N. Role of tumor microenvironment in ovarian cancer pathobiology. *Oncotarget*. 2018;9(32):22832-22849. doi:10.18632/oncotarget.25126

63. Walker C, Mojares E, del Río Hernández A. Role of Extracellular Matrix in Development and Cancer Progression. *Int J Mol Sci*. 2018;19(10):3028. doi:10.3390/ijms19103028

64. Lu P, Takai K, Weaver VM, Werb Z. Extracellular Matrix Degradation and Remodeling in Development and Disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2011;3(12):a005058. doi:10.1101/cshperspect.a005058

65. Holle AW, Young JL, Spatz JP. In vitro cancer cell–ECM interactions inform in vivo cancer treatment. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2016;97:270-279. doi:10.1016/j.addr.2015.10.007

66. Kai F, Drain AP, Weaver VM. The Extracellular Matrix Modulates the Metastatic Journey. *Developmental Cell*. 2019;49(3):332-346. doi:10.1016/j.devcel.2019.03.026

67. Clement PB. Anatomy and Histology of the Ovary. :33.

68. Duval K, Grover H, Han LH, et al. Modeling Physiological Events in 2D vs. 3D Cell Culture. 2017;32:12.

69. Gilmore AC, Flaherty SJ, Somasundaram V, et al. An in vitro tumorigenesis model based on live-cell-generated oxygen and nutrient gradients. *Commun Biol*. 2021;4(1):1-13. doi:10.1038/s42003-021-01954-0

70. Emami Nejad A, Najafgholian S, Rostami A, et al. The role of hypoxia in the tumor microenvironment and development of cancer stem cell: a novel approach to developing treatment. *Cancer Cell International*. 2021;21(1):62. doi:10.1186/s12935-020-01719-5

71. Imamura Y, Mukohara T, Shimono Y, et al. Comparison of 2D- and 3D-culture models as drug-testing platforms in breast cancer. *Oncology Reports*. 2015;33(4):1837-1843. doi:10.3892/or.2015.3767

72. Zanoni M, Cortesi M, Zamagni A, Arienti C, Pignatta S, Tesei A. Modeling neoplastic disease with spheroids and organoids. *Journal of Hematology & Oncology*. 2020;13(1):97. doi:10.1186/s13045-020-00931-0

73. Sant S, Johnston PA. The Production of 3D Tumor Spheroids for Cancer Drug Discovery. *Drug Discov Today Technol*. 2017;23:27-36. doi:10.1016/j.ddtec.2017.03.002

74. Fang Y, Eglen RM. Three-Dimensional Cell Cultures in Drug Discovery and Development. *SLAS Discov*. 2017;22(5):456-472. doi:10.1177/1087057117696795

75. Chaicharoenaudomrung N, Kunhorm P, Noisa P. Three-dimensional cell culture systems as an in vitro platform for cancer and stem cell modeling. *World J Stem Cells*. 2019;11(12):1065-1083. doi:10.4252/wjsc.v11.i12.1065

76. Habanjar O, Diab-Assaf M, Caldefie-Chezet F, Delort L. 3D Cell Culture Systems: Tumor Application, Advantages, and Disadvantages. *Int J Mol Sci*. 2021;22(22):12200. doi:10.3390/ijms222212200

77. van den Brand D, Veelken C, Massuger L, Brock R. Penetration in 3D tumor spheroids and explants: Adding a further dimension to the structure-activity relationship of cell-penetrating peptides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. 2018;1860(6):1342-1349. doi:10.1016/j.bbamem.2018.03.007

78. Langhans SA. Three-Dimensional in Vitro Cell Culture Models in Drug Discovery and Drug Repositioning. *Front Pharmacol*. 2018;9:6.

79. Han SJ, Kwon S, Kim KS. Challenges of applying multicellular tumor spheroids in preclinical phase. *Cancer Cell International*. 2021;21(1):152. doi:10.1186/s12935-021-01853-8

80. Reddy MSB, Ponnamma D, Choudhary R, Sadasivuni KK. A Comparative Review of Natural and Synthetic Biopolymer Composite Scaffolds. *Polymers*. 2021;13(7):1105. doi:10.3390/polym13071105

81. Kamatar A, Gunay G, Acar H. Natural and Synthetic Biomaterials for Engineering Multicellular Tumor Spheroids. *Polymers*. 2020;12(11):2506. doi:10.3390/polym12112506

82. Barua E, Deoghare AB, Deb P, Lala SD. Naturally derived biomaterials for development of composite bone scaffold: A review. *IOP Conf Ser: Mater Sci Eng*. 2018;377:012013. doi:10.1088/1757-899X/377/1/012013

83. Cui X, Hartanto Y, Zhang H. Advances in multicellular spheroids formation. *J R Soc Interface*. 2017;14(127). doi:10.1098/rsif.2016.0877

84. Gupta N, Liu JR, Patel B, Solomon DE, Vaidya B, Gupta V. Microfluidics-based 3D cell culture models: Utility in novel drug discovery and delivery research. *Bioeng Transl Med*. 2016;1(1):63-81. doi:10.1002/btm2.10013

85. Zhang B, Chen F, Xu Q, et al. Revisiting ovarian cancer microenvironment: a friend or a foe? *Protein Cell*. 2018;9(8):674-692. doi:10.1007/s13238-017-0466-7

86. Unnikrishnan K, Thomas LV, Ram Kumar RM. Advancement of Scaffold-Based 3D Cellular Models in Cancer Tissue Engineering: An Update. *Front Oncol*. 2021;11:733652. doi:10.3389/fonc.2021.733652

87. Lazzari G, Couvreur P, Mura S. Multicellular tumor spheroids: a relevant 3D model for the in vitro preclinical investigation of polymer nanomedicines. *Polym Chem*. 2017;8(34):4947-4969. doi:10.1039/C7PY00559H

88. admin.facellitate. Spheroid culture techniques. faCellitate. Published March 1, 2022. Accessed February 7, 2023. https://facellitate.com/spheroid-culture-techniques/

89. Raghavan S, Mehta P, Horst EN, Ward MR, Rowley KR, Mehta G. Comparative analysis of tumor spheroid generation techniques for differential in vitro drug toxicity. *Oncotarget*. 2016;7(13):16948-16961. doi:10.18632/oncotarget.7659

90. 3D cell culture methods and applications - a short review. Elveflow. Accessed June 26, 2023. https://www.elveflow.com/microfluidic-reviews/organs-on-chip-3d-cell-culture/3d-cell-culture-methods-and-applications-a-short-review/

91. Breslin S, O'Driscoll L. Three-dimensional cell culture: the missing link in drug discovery. *Drug Discovery Today*. 2013;18(5):240-249. doi:10.1016/j.drudis.2012.10.003

92. Sargent B. A New Dimension of Cell Culture: The Rise of Spheroid Culture Systems. Cell Culture Dish. Published February 6, 2019. Accessed June 21, 2023. https://cellculturedish.com/cell-culture-spheroid-culture-systems/

93. Lin RZ, Lin RZ, Chang HY. Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research. *Biotechnol J*. 2008;3(9-10):1172-1184. doi:10.1002/biot.200700228

94. Kim JB. Three-dimensional tissue culture models in cancer biology. *Semin Cancer Biol*. 2005;15(5):365-377. doi:10.1016/j.semcancer.2005.05.002

95. Rodday B, Hirschhaeuser F, Walenta S, Mueller-Klieser W. Semiautomatic Growth Analysis of Multicellular Tumor Spheroids. *J Biomol Screen*. 2011;16(9):1119-1124. doi:10.1177/1087057111419501

96. Türker E, Demirçak N, Arslan-Yildiz A. Scaffold-free three-dimensional cell culturing using magnetic levitation. *Biomater Sci*. 2018;6(7):1745-1753. doi:10.1039/c8bm00122g

97. Al Habyan S, Kalos C, Szymborski J, McCaffrey L. Multicellular detachment generates metastatic spheroids during intra-abdominal dissemination in epithelial ovarian cancer. *Oncogene*. 2018;37(37):5127-5135. doi:10.1038/s41388-018-0317-x

98. Gao Q, Yang Z, Xu S, et al. Heterotypic CAF-tumor spheroids promote early peritoneal metastatis of ovarian cancer. *J Exp Med*. 2019;216(3):688-703. doi:10.1084/jem.20180765

99. Velletri T, Villa CE, Cilli D, et al. Single cell-derived spheroids capture the self-renewing subpopulations of metastatic ovarian cancer. *Cell Death Differ*. 2022;29(3):614-626. doi:10.1038/s41418-021-00878-w

100. Yin M, Li X, Tan S, et al. Tumor-associated macrophages drive spheroid formation during early transcoelomic metastasis of ovarian cancer. *J Clin Invest*. 126(11):4157-4173. doi:10.1172/JCI87252

101. Jiang Y, Zhou T, Shi Y, Feng W, Lyu T. A SMYD3/ITGB6/TGFβ1 Positive Feedback Loop Promotes the Invasion and Adhesion of Ovarian Cancer Spheroids. *Front Oncol*. 2021;11:690618. doi:10.3389/fonc.2021.690618

102. Singha B, Laski J, Ramos Valdés Y, Liu E, DiMattia GE, Shepherd TG. Inhibiting ULK1 kinase decreases autophagy and cell viability in high-grade serous ovarian cancer spheroids. *Am J Cancer Res*. 2020;10(5):1384-1399.

103. Long L, Yin M, Min AW. 3D Co-culture System of Tumor-associated Macrophages and Ovarian Cancer Cells. *Bio Protoc*. 2018;8(8):e2815. doi:10.21769/BioProtoc.2815

104. Shishido A, Mori S, Yokoyama Y, et al. Mesothelial cells facilitate cancer stem-like properties in spheroids of ovarian cancer cells. *Oncology Reports*. 2018;40(4):2105-2114. doi:10.3892/or.2018.6605

105. Raghavan S, Mehta P, Ward MR, et al. Personalized Medicine-Based Approach to Model Patterns of Chemoresistance and Tumor Recurrence Using Ovarian Cancer Stem Cell Spheroids. *Clin Cancer Res*. 2017;23(22):6934-6945. doi:10.1158/1078-0432.CCR-17-0133

106. Park H, Hwang S, Jeong JY, et al. Integrative analysis of transcription factors and microRNAs in ovarian cancer cell spheroids. *J Ovarian Res*. 2020;13:16. doi:10.1186/s13048-020-00618-7

107. Ward Rashidi MR, Mehta P, Bregenzer M, et al. Engineered 3D Model of Cancer Stem Cell Enrichment and Chemoresistance. *Neoplasia*. 2019;21(8):822-836. doi:10.1016/j.neo.2019.06.005

108. Yamawaki K, Mori Y, Sakai H, et al. Integrative analyses of gene expression and chemosensitivity of patient-derived ovarian cancer spheroids link G6PD-driven redox metabolism to cisplatin chemoresistance. *Cancer Letters*. 2021;521:29-38. doi:10.1016/j.canlet.2021.08.018

109. Casagrande N, Borghese C, Agostini F, et al. In Ovarian Cancer Multicellular Spheroids, Platelet Releasate Promotes Growth, Expansion of ALDH+ and CD133+ Cancer Stem Cells, and Protection against the Cytotoxic Effects of Cisplatin, Carboplatin and Paclitaxel. *Int J Mol Sci*. 2021;22(6):3019. doi:10.3390/ijms22063019

110. Sun Y, Li S, Yang L, et al. CDC25A Facilitates Chemo-resistance in Ovarian Cancer Multicellular Spheroids by Promoting E-cadherin Expression and Arresting Cell Cycles. *J Cancer*. 2019;10(13):2874-2884. doi:10.7150/jca.31329

111. Gunay G, Kirit HA, Kamatar A, Baghdasaryan O, Hamsici S, Acar H. The effects of size and shape of the ovarian cancer spheroids on the drug resistance and migration. *Gynecol Oncol*. 2020;159(2):563-572. doi:10.1016/j.ygyno.2020.09.002

112. Uddin MM, Gaire B, Vancurova I. Interleukin-8 Induces Proliferation of Ovarian Cancer Cells in 3D Spheroids. *Methods Mol Biol*. 2020;2108:117-124. doi:10.1007/978-1-0716-0247-8_10

113. Tofani LB, Abriata JP, Luiz MT, Marchetti JM, Swiech K. Establishment and characterization of an in vitro 3D ovarian cancer model for drug screening assays. *Biotechnology Progress*. 2020;36(6):e3034. doi:10.1002/btpr.3034

114. Tofani LB, Sousa LO, Luiz MT, et al. Generation of a Three-Dimensional in Vitro Ovarian Cancer Co-Culture Model for Drug Screening Assays. *JPharmSci*. 2021;110(7):2629-2636. doi:10.1016/j.xphs.2021.04.003

115. Hedemann N, Herz A, Schiepanski JH, et al. ADAM17 Inhibition Increases the Impact of Cisplatin Treatment in Ovarian Cancer Spheroids. *Cancers (Basel)*. 2021;13(9):2039. doi:10.3390/cancers13092039

116. Winter SJ, Miller HA, Steinbach-Rankins JM. Multicellular Ovarian Cancer Model for Evaluation of Nanovector Delivery in Ascites and Metastatic Environments. *Pharmaceutics*. 2021;13(11):1891. doi:10.3390/pharmaceutics13111891

117. Artegiani B, Clevers H. Use and application of 3D-organoid technology. *Human Molecular Genetics*. 2018;27(R2):R99-R107. doi:10.1093/hmg/ddy187

118. Kim J, Koo BK, Knoblich JA. Human organoids: model systems for human biology and medicine. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2020;21(10):571-584. doi:10.1038/s41580-020-0259-3

119. Kozlowski MT, Crook CJ, Ku HT. Towards organoid culture without Matrigel. *Commun Biol*. 2021;4(1):1-15. doi:10.1038/s42003-021-02910-8

120. Almeqdadi M, Mana MD, Roper J, Yilmaz ÖH. Gut organoids: mini-tissues in culture to study intestinal physiology and disease. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2019;317(3):C405-C419. doi:10.1152/ajpcell.00300.2017

121. Mun SJ, Lee J, Chung KS, Son MY, Son MJ. Effect of Microbial Short-Chain Fatty Acids on CYP3A4-Mediated Metabolic Activation of Human Pluripotent Stem Cell-Derived Liver Organoids. *Cells*. 2021;10(1):126. doi:10.3390/cells10010126

122. Tuveson D, Clevers H. Cancer modeling meets human organoid technology. *Science*. 2019;364(6444):952-955. doi:10.1126/science.aaw6985

123. LeSavage BL, Suhar RA, Broguiere N, Lutolf MP, Heilshorn SC. Next-generation cancer organoids. *Nat Mater*. 2022;21(2):143-159. doi:10.1038/s41563-021-01057-5

124. Driehuis E, Kretzschmar K, Clevers H. Establishment of patient-derived cancer organoids for drug-screening applications. *Nat Protoc*. 2020;15(10):3380-3409. doi:10.1038/s41596-020-0379-4

125. Urbischek M, Rannikmae H, Foets T, Ravn K, Hyvönen M, de la Roche M. Organoid culture media formulated with growth factors of defined cellular activity. *Sci Rep*. 2019;9(1):6193. doi:10.1038/s41598-019-42604-0

126. Xu L, Lin W, Wen L, Li G. Lgr5 in cancer biology: functional identification of Lgr5 in cancer progression and potential opportunities for novel therapy. *Stem Cell Research & Therapy*. 2019;10(1):219. doi:10.1186/s13287-019-1288-8

127. Nam MO, Hahn S, Jee JH, et al. Effects of a small molecule R-spondin-1 substitute RS-246204 on a mouse intestinal organoid culture. *Oncotarget*. 2017;9(5):6356-6368. doi:10.18632/oncotarget.23721

128. Kopper O, de Witte CJ, Lõhmussaar K, et al. An organoid platform for ovarian cancer captures intra- and interpatient heterogeneity. *Nature Medicine*. 2019;25(5):838-849. doi:10.1038/s41591-019-0422-6

129. Maenhoudt N, Vankelecom H. Protocol for establishing organoids from human ovarian cancer biopsies. *STAR Protoc*. 2021;2(2):100429. doi:10.1016/j.xpro.2021.100429

130. Witte CJ de, Valle-Inclan JE, Hami N, et al. Patient-Derived Ovarian Cancer Organoids Mimic Clinical Response and Exhibit Heterogeneous Inter- and Intrapatient Drug Responses. *Cell Reports*. 2020;31(11). doi:10.1016/j.celrep.2020.107762

131. Gorski JW, Zhang Z, McCorkle JR, et al. Utilizing Patient-Derived Epithelial Ovarian Cancer Tumor Organoids to Predict Carboplatin Resistance. *Biomedicines*. 2021;9(8):1021. doi:10.3390/biomedicines9081021

132. Tao M, Sun F, Wang J, et al. Developing patient-derived organoids to predict PARP inhibitor response and explore resistance overcoming strategies in ovarian cancer. *Pharmacological Research*. 2022;179:106232. doi:10.1016/j.phrs.2022.106232

133. Maenhoudt N, Defraye C, Boretto M, et al. Developing Organoids from Ovarian Cancer as Experimental and Preclinical Models. *Stem Cell Reports*. 2020;14(4):717-729. doi:10.1016/j.stemcr.2020.03.004

134. Bi J, Newtson AM, Zhang Y, et al. Successful Patient-Derived Organoid Culture of Gynecologic Cancers for Disease Modeling and Drug Sensitivity Testing. *Cancers (Basel)*. 2021;13(12):2901. doi:10.3390/cancers13122901

135. Vernon M, Lambert B, Meryet-Figuière M, et al. Functional miRNA Screening Identifies Wide-ranging Antitumor Properties of miR-3622b-5p and Reveals a New Therapeutic Combination Strategy in Ovarian Tumor Organoids. *Molecular Cancer Therapeutics*. 2020;19(7):1506-1519. doi:10.1158/1535-7163.MCT-19-0510

136. Chen H, Gotimer K, De Souza C, et al. Short-term organoid culture for drug sensitivity testing of high-grade serous carcinoma. *Gynecol Oncol*. 2020;157(3):783-792. doi:10.1016/j.ygyno.2020.03.026

137. Hill SJ, Decker B, Roberts EA, et al. Prediction of DNA Repair Inhibitor Response in Short Term Patient-Derived Ovarian Cancer Organoids. *Cancer Discov*. 2018;8(11):1404-1421. doi:10.1158/2159-8290.CD-18-0474

138. Nanki Y, Chiyoda T, Hirasawa A, et al. Patient-derived ovarian cancer organoids capture the genomic profiles of primary tumours applicable for drug sensitivity and resistance testing. *Scientific Reports*. 2020;10(1):12581. doi:10.1038/s41598-020-69488-9

139. BI J, THIEL KW, LITMAN JM, et al. Characterization of a TP53 Somatic Variant of Unknown Function From an Ovarian Cancer Patient Using Organoid Culture and Computational Modeling. *Clin Obstet Gynecol*. 2020;63(1):109-119. doi:10.1097/GRF.0000000000000516

140. Sun H, Wang H, Wang X, et al. Aurora-A/SOX8/FOXK1 signaling axis promotes chemoresistance via suppression of cell senescence and induction of glucose metabolism in ovarian cancer organoids and cells. *Theranostics*. 2020;10(15):6928-6945. doi:10.7150/thno.43811

141. Wang Z, Chen W, Zuo L, et al. The Fibrillin-1/VEGFR2/STAT2 signaling axis promotes chemoresistance via modulating glycolysis and angiogenesis in ovarian cancer organoids and cells. *Cancer Commun (Lond)*. 2022;42(3):245-265. doi:10.1002/cac2.12274

142. Wambecke A, Ahmad M, Morice P, et al. The lncRNA 'UCA1' modulates the response to chemotherapy of ovarian cancer through direct binding to miR-27a-5p and control of UBE2N levels. *Mol Oncol*. 2021;15(12):3659-3678. doi:10.1002/1878-0261.13045

143. Lõhmussaar K, Kopper O, Korving J, et al. Assessing the origin of high-grade serous ovarian cancer using CRISPR-modification of mouse organoids. *Nat Commun*. 2020;11:2660. doi:10.1038/s41467-020-16432-0

144. Yucer N, Ahdoot R, Workman MJ, et al. Human iPSC-derived fallopian tube organoids with BRCA1 mutation recapitulate early-stage carcinogenesis. *Cell Rep*. 2021;37(13):110146. doi:10.1016/j.celrep.2021.110146

145. Kawata M, Kondo J, Onuma K, et al. Polarity switching of ovarian cancer cell clusters via SRC family kinase is involved in the peritoneal dissemination. *Cancer Sci*. Published online July 18, 2022. doi:10.1111/cas.15493

146. Boretto M, Cox B, Noben M, et al. Development of organoids from mouse and human endometrium showing endometrial epithelium physiology and long-term expandability. *Development*. 2017;144(10):1775-1786. doi:10.1242/dev.148478

147. Boretto M, Maenhoudt N, Luo X, et al. Patient-derived organoids from endometrial disease capture clinical heterogeneity and are amenable to drug screening. *Nat Cell Biol*. 2019;21(8):1041-1051. doi:10.1038/s41556-019-0360-z

148. Sisman Y, Schnack T, Høgdall E, Høgdall C. Organoids and epithelial ovarian cancer - a future tool for personalized treatment decisions? (Review). *Mol Clin Oncol*. 2022;16(2):29. doi:10.3892/mco.2021.2462

149. Li L, Knutsdottir H, Hui K, et al. Human primary liver cancer organoids reveal intratumor and interpatient drug response heterogeneity. *JCI Insight*. 2019;4(2):e121490. doi:10.1172/jci.insight.121490

150. Aisenbrey EA, Murphy WL. Synthetic alternatives to Matrigel. *Nat Rev Mater*. 2020;5(7):539-551. doi:10.1038/s41578-020-0199-8

151. Cooperstein MA, Canavan HE. Assessment of cytotoxicity of (N-isopropyl acrylamide) and poly(N-isopropyl acrylamide)-coated surfaces. *Biointerphases*. 2013;8(1):19. doi:10.1186/1559-4106-8-19

152. Mandrycky C, Wang Z, Kim K, Kim DH. 3D Bioprinting for Engineering Complex Tissues. *Biotechnol Adv*. 2016;34(4):422-434. doi:10.1016/j.biotechadv.2015.12.011

153. Dey M, Ozbolat IT. 3D bioprinting of cells, tissues and organs. *Sci Rep*. 2020;10:14023. doi:10.1038/s41598-020-70086-y

154. Hong N, Yang GH, Lee J, Kim G. 3D bioprinting and its in vivo applications. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. 2018;106(1):444-459. doi:10.1002/jbm.b.33826

155. Fang Y, Guo Y, Liu T, et al. Advances in 3D Bioprinting. *Chinese Journal of Mechanical Engineering: Additive Manufacturing Frontiers*. 2022;1(1):100011. doi:10.1016/j.cjmeam.2022.100011

156. Gu Z, Fu J, Lin H, He Y. Development of 3D bioprinting: From printing methods to biomedical applications. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2020;15(5):529-557. doi:10.1016/j.ajps.2019.11.003

157. Hagenbuchner J, Nothdurfter D, Ausserlechner MJ. 3D bioprinting: novel approaches for engineering complex human tissue equivalents and drug testing. *Essays in Biochemistry*. 2021;65(3):417-427. doi:10.1042/EBC20200153

158. Xie Z, Gao M, Lobo AO, Webster TJ. 3D Bioprinting in Tissue Engineering for Medical Applications: The Classic and the Hybrid. *Polymers (Basel)*. 2020;12(8):1717. doi:10.3390/polym12081717

159. Gillispie G, Prim P, Copus J, et al. Assessment Methodologies for Extrusion-Based Bioink Printability. *Biofabrication*. 2020;12(2):022003. doi:10.1088/1758-5090/ab6f0d

160. Naghieh S, Chen X. Printability-A key issue in extrusion-based bioprinting. *J Pharm Anal*. 2021;11(5):564-579. doi:10.1016/j.jpha.2021.02.001

161. Ramesh S, Harrysson OLA, Rao PK, et al. Extrusion bioprinting: Recent progress, challenges, and future opportunities. *Bioprinting*. 2021;21(e00116). doi:10.1016/j.bprint.2020.e00116

162. Zhang YS, Haghiashtiani G, Hübscher T, et al. 3D extrusion bioprinting. *Nat Rev Methods Primers*. 2021;1(1):1-20. doi:10.1038/s43586-021-00073-8

163. Suntornnond R, Tan EYS, An J, Chua CK. A Mathematical Model on the Resolution of Extrusion Bioprinting for the Development of New Bioinks. *Materials (Basel)*. 2016;9(9):756. doi:10.3390/ma9090756

164. Fu Z, Naghieh S, Xu C, Wang C, Sun W, Chen X. Printability in extrusion bioprinting. *Biofabrication*. 2021;13(3):033001. doi:10.1088/1758-5090/abe7ab

165. Malekpour A, Chen X. Printability and Cell Viability in Extrusion-Based Bioprinting from Experimental, Computational, and Machine Learning Views. *JFB*. 2022;13(2):40. doi:10.3390/jfb13020040

166. Tajik S, Garcia CN, Gillooley S, Tayebi L. 3D Printing of Hybrid-Hydrogel Materials for Tissue Engineering: a Critical Review. *Regen Eng Transl Med*. 2023;9(1):29-41. doi:10.1007/s40883-022-00267-w

167. Schwab A, Levato R, D'Este M, Piluso S, Eglin D, Malda J. Printability and Shape Fidelity of Bioinks in 3D Bioprinting. *Chem Rev*. 2020;120(19):11028-11055. doi:10.1021/acs.chemrev.0c00084

168. Hospodiuk M, Dey M, Sosnoski D, Ozbolat IT. The bioink: A comprehensive review on bioprintable materials. *Biotechnol Adv*. 2017;35(2):217-239. doi:10.1016/j.biotechadv.2016.12.006

169. Duan B, Kapetanovic E, Hockaday LA, Butcher JT. Three-dimensional printed trileaflet valve conduits using biological hydrogels and human valve interstitial cells. *Acta Biomater*. 2014;10(5):1836-1846. doi:10.1016/j.actbio.2013.12.005

170. Zhao Y, Li Y, Mao S, Sun W, Yao R. The influence of printing parameters on cell survival rate and printability in microextrusion-based 3D cell printing technology. *Biofabrication*. 2015;7(4):045002. doi:10.1088/1758-5090/7/4/045002

171. Hou X, Chen G, Xing T, Wei Z. Reactive ink formulated with various alcohols for improved properties and printing quality onto cotton fabrics. *Journal of Engineered Fibers and Fabrics*. 2019;14:1558925019849242. doi:10.1177/1558925019849242

172. Jain T, Baker HB, Gipsov A, et al. Impact of cell density on the bioprinting of gelatin methacrylate (GelMA) bioinks. *Bioprinting*. 2021;22:e00131. doi:10.1016/j.bprint.2021.e00131

173. Rocca M, Fragasso A, Liu W, Heinrich MA, Zhang YS. Embedded Multimaterial Extrusion Bioprinting. *SLAS Technol*. 2018;23(2):154-163. doi:10.1177/2472630317742071

174. wallmanderco. Six ways BIO X is designed for your success. CELLINK. Accessed February 7, 2023. https://www.cellink.com/blog/six-ways-bio-x-is-designed-for-your-success/

175. Kang HW, Lee SJ, Ko IK, Kengla C, Yoo JJ, Atala A. A 3D bioprinting system to produce human-scale tissue constructs with structural integrity. *Nat Biotechnol*. 2016;34(3):312-319. doi:10.1038/nbt.3413

176. Kjar A, McFarland B, Mecham K, Harward N, Huang Y. Engineering of tissue constructs using coaxial bioprinting. *Bioactive Materials*. 2021;6(2):460-471. doi:10.1016/j.bioactmat.2020.08.020

177. Duan B, Hockaday LA, Kang KH, Butcher JT. 3D Bioprinting of Heterogeneous Aortic Valve Conduits with Alginate/Gelatin Hydrogels. *J Biomed Mater Res A*. 2013;101(5):1255-1264. doi:10.1002/jbm.a.34420

178. Hull SM, Brunel LG, Heilshorn SC. 3D Bioprinting of Cell-Laden Hydrogels for Improved Biological Functionality. *Advanced Materials*. 2022;34(2):2103691. doi:10.1002/adma.202103691

179. Müller B, Lang S, Dominietto M, et al. High-resolution tomographic imaging of microvessels. In: Stock SR, ed. ; 2008:70780B. doi:10.1117/12.794157

180. Liu F, Liu C, Chen Q, et al. Progress in organ 3D bioprinting. *Int J Bioprint*. 2018;4(1):128. doi:10.18063/IJB.v4i1.128

181. Kačarević ŽP, Rider PM, Alkildani S, et al. An Introduction to 3D Bioprinting: Possibilities, Challenges and Future Aspects. *Materials (Basel)*. 2018;11(11):2199. doi:10.3390/ma11112199

182. Hölzl K, Lin S, Tytgat L, Vlierberghe SV, Gu L, Ovsianikov A. Bioink properties before, during and after 3D bioprinting. *Biofabrication*. 2016;8(3):032002. doi:10.1088/1758-5090/8/3/032002

183. Koch L, Brandt O, Deiwick A, Chichkov B. Laser-assisted bioprinting at different wavelengths and pulse durations with a metal dynamic release layer: A parametric study. *Int J Bioprint*. 2017;3(1):001. doi:10.18063/IJB.2017.01.001

184. Zheng Z, Eglin D, Alini M, Richards GR, Qin L, Lai Y. Visible Light-Induced 3D Bioprinting Technologies and Corresponding Bioink Materials for Tissue Engineering: A Review. *Engineering*. 2021;7(7):966-978. doi:10.1016/j.eng.2020.05.021

185. Neufeld L, Yeini E, Pozzi S, Satchi-Fainaro R. 3D bioprinted cancer models: from basic biology to drug development. *Nat Rev Cancer*. Published online October 24, 2022:1-14. doi:10.1038/s41568-022-00514-w

186. Xu F, Celli J, Rizvi I, Moon S, Hasan T, Demirci U. A three-dimensional in vitro ovarian cancer coculture model using a high-throughput cell patterning platform. *Biotechnol J*. 2011;6(2):204-212. doi:10.1002/biot.201000340

187. Wu D, Berg J, Arlt B, et al. Bioprinted Cancer Model of Neuroblastoma in a Renal Microenvironment as an Efficiently Applicable Drug Testing Platform. *Int J Mol Sci*. 2021;23(1):122. doi:10.3390/ijms23010122

188. Dai X, Ma C, Lan Q, Xu T. 3D bioprinted glioma stem cells for brain tumor model and applications of drug susceptibility. *Biofabrication*. 2016;8(4):045005. doi:10.1088/1758-5090/8/4/045005

189. Smits IPM, Blaschuk OW, Willerth SM. Novel N-cadherin antagonist causes glioblastoma cell death in a 3D bioprinted co-culture model. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2020;529(2):162-168. doi:10.1016/j.bbrc.2020.06.001

190. Dankó T, Petővári G, Raffay R, et al. Characterisation of 3D Bioprinted Human Breast Cancer Model for In Vitro Drug and Metabolic Targeting. *Int J Mol Sci*. 2022;23(13):7444. doi:10.3390/ijms23137444

191. Chen H, Cheng Y, Wang X, et al. 3D printed in vitro tumor tissue model of colorectal cancer. *Theranostics*. 2020;10(26):12127-12143. doi:10.7150/thno.52450

192. Sbirkov Y, Molander D, Milet C, et al. A Colorectal Cancer 3D Bioprinting Workflow as a Platform for Disease Modeling and Chemotherapeutic Screening. *Front Bioeng Biotechnol*. 2021;9:755563. doi:10.3389/fbioe.2021.755563

193. Lopez J, Ruiz-Toranzo M, Antich C, et al. Biofabrication of a Tri-layered 3D-Bioprinted CSC-based Malignant Melanoma Model for Personalized Cancer Treatment. *Biofabrication*. 2022;10(1080):1758-5090. doi:10.1088/1758-5090/ac8dc6

194. Wu D, Wang Z, Li J, et al. A 3D-Bioprinted Multiple Myeloma Model. *Advanced Healthcare Materials*. 2022;11(7):2100884. doi:10.1002/adhm.202100884

195. Chen Y, Xu L, Li W, et al. 3D bioprinted tumor model with extracellular matrix enhanced bioinks for nanoparticle evaluation. *Biofabrication*. 2022;14(2):025002. doi:10.1088/1758-5090/ac48e4

196. Herrada-Manchón H, Celada L, Rodríguez-González D, Alejandro Fernández M, Aguilar E, Chiara MD. Three-dimensional bioprinted cancer models: A powerful platform for investigating tunneling nanotube-like cell structures in complex microenvironments. *Materials Science and Engineering: C*. 2021;128:112357. doi:10.1016/j.msec.2021.112357

197. Tang M, Xie Q, Gimple RC, et al. Three-dimensional bioprinted glioblastoma microenvironments model cellular dependencies and immune interactions. *Cell Res*. 2020;30(10):833-853. doi:10.1038/s41422-020-0338-1

198. Heinrich MA, Bansal R, Lammers T, Zhang YS, Michel Schiffelers R, Prakash J. 3D-Bioprinted Mini-Brain: A Glioblastoma Model to Study Cellular Interactions and Therapeutics. *Advanced Materials*. 2019;31(14):1806590. doi:10.1002/adma.201806590

199. Grunewald L, Lam T, Andersch L, et al. A Reproducible Bioprinted 3D Tumor Model Serves as a Preselection Tool for CAR T Cell Therapy Optimization. *Front Immunol*. 2021;12:689697. doi:10.3389/fimmu.2021.689697

200. Wang X, Li X, Ding J, et al. 3D bioprinted glioma microenvironment for glioma vascularization. *J Biomed Mater Res A*. 2021;109(6):915-925. doi:10.1002/jbm.a.37082

201. Jung M, Skhinas JN, Du EY, et al. A high-throughput 3D bioprinted cancer cell migration and invasion model with versatile and broad biological applicability. *Biomater Sci*. 2022;10(20):5876-5887. doi:10.1039/D2BM00651K

202. Wang X, Zhang X, Dai X, et al. Tumor-like lung cancer model based on 3D bioprinting. *3 Biotech*. 2018;8(12):501. doi:10.1007/s13205-018-1519-1

203. Pellegrini E, Desando G, Petretta M, et al. A 3D Collagen-Based Bioprinted Model to Study Osteosarcoma Invasiveness and Drug Response. *Polymers (Basel)*. 2022;14(19):4070. doi:10.3390/polym14194070

204. Wang Y, Shi W, Kuss M, et al. 3D Bioprinting of Breast Cancer Models for Drug Resistance Study. *ACS Biomater Sci Eng*. 2018;4(12):4401-4411. doi:10.1021/acsbiomaterials.8b01277

205. Hong S, Song JM. 3D bioprinted drug-resistant breast cancer spheroids for quantitative in situ evaluation of drug resistance. *Acta Biomaterialia*. 2022;138:228-239. doi:10.1016/j.actbio.2021.10.031

206. Wang X, Dai X, Zhang X, et al. 3D bioprinted glioma cell-laden scaffolds enriching glioma stem cells via epithelial–mesenchymal transition. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2019;107(2):383-391. doi:10.1002/jbm.a.36549

207. Horder H, Guaza Lasheras M, Grummel N, et al. Bioprinting and Differentiation of Adipose-Derived Stromal Cell Spheroids for a 3D Breast Cancer-Adipose Tissue Model. *Cells*. 2021;10(4):803. doi:10.3390/cells10040803

208. Chaji S, Al-Saleh J, Gomillion CT. Bioprinted Three-Dimensional Cell-Laden Hydrogels to Evaluate Adipocyte-Breast Cancer Cell Interactions. *Gels*. 2020;6(1):10. doi:10.3390/gels6010010

209. Fairfield H, Dudakovic A, Khatib CM, et al. Myeloma-modified adipocytes exhibit metabolic dysfunction and a senescence-associated secretory phenotype (SASP). *Cancer Res*. 2021;81(3):634-647. doi:10.1158/0008-5472.CAN-20-1088

210. Heher EC, Rennke HG, Laubach JP, Richardson PG. Kidney Disease and Multiple Myeloma. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2013;8(11):2007-2017. doi:10.2215/CJN.12231212

211. Riehl BD, Kim E, Bouzid T, Lim JY. The Role of Microenvironmental Cues and Mechanical Loading Milieus in Breast Cancer Cell Progression and Metastasis. *Front Bioeng Biotechnol*. 2020;8:608526. doi:10.3389/fbioe.2020.608526

212. Whitesides GM. The origins and the future of microfluidics. *Nature*. 2006;442(7101):368-373. doi:10.1038/nature05058

213. Novak R, Didier M, Calamari E, et al. Scalable Fabrication of Stretchable, Dual Channel, Microfluidic Organ Chips. *J Vis Exp*. 2018;(140):58151. doi:10.3791/58151

214. Whitesides GM. The origins and the future of microfluidics. *Nature*. 2006;442(7101):368-373. doi:10.1038/nature05058

215. Figeys D, Gygi SP, McKinnon G, Aebersold R. An integrated microfluidics-tandem mass spectrometry system for automated protein analysis. *Anal Chem*. 1998;70(18):3728-3734. doi:10.1021/ac980320p

216. Ehrlich DJ, Matsudaira P. Microfluidic devices for DNA analysis. *Trends Biotechnol*. 1999;17(8):315-319. doi:10.1016/s0167-7799(99)01310-4

217. Leclerc E, Sakai Y, Fujii T. Microfluidic PDMS (polydimethylsiloxane) bioreactor for large-scale culture of hepatocytes. *Biotechnol Prog*. 2004;20(3):750-755. doi:10.1021/bp0300568

218. Huh D, Matthews BD, Mammoto A, Montoya-Zavala M, Yuan Hsin H, Ingber DE. Reconstituting Organ-Level Lung Functions on a Chip. *Science*. 2010;328(5986):1662-1668. doi:10.1126/science.1188302

219. Bhatia SN, Ingber DE. Microfluidic organs-on-chips. *Nat Biotechnol*. 2014;32(8):760-772. doi:10.1038/nbt.2989

220. Sontheimer-Phelps A, Hassell BA, Ingber DE. Modelling cancer in microfluidic human organs-on-chips. *Nat Rev Cancer*. 2019;19(2):65-81. doi:10.1038/s41568-018-0104-6

221. Carter SSD, Atif AR, Kadekar S, et al. PDMS leaching and its implications for on-chip studies focusing on bone regeneration applications. *Organs-on-a-Chip*. 2020;2:100004. doi:10.1016/j.ooc.2020.100004

222. Miranda I, Souza A, Sousa P, et al. Properties and Applications of PDMS for Biomedical Engineering: A Review. *J Funct Biomater*. 2021;13(1):2. doi:10.3390/jfb13010002

223. Team Elveflow E. PDMS: A review. Elveflow. Published February 5, 2021. Accessed February 9, 2023. https://www.elveflow.com/microfluidic-reviews/general-microfluidics/the-polydimethylsiloxane-pdms-and-microfluidics/

224. Wang L, Sun B, Ziemer KS, Barabino GA, Carrier RL. Chemical and physical modifications to poly(dimethylsiloxane) surfaces affect adhesion of Caco-2 cells. *J Biomed Mater Res*. 2009;93(4):1260-1271. doi:10.1002/jbm.a.32621

225. Campbell SB, Wu Q, Yazbeck J, Liu C, Okhovatian S, Radisic M. Beyond Polydimethylsiloxane: Alternative Materials for Fabrication of Organ-on-a-Chip Devices and Microphysiological Systems. *ACS Biomater Sci Eng*. 2021;7(7):2880-2899. doi:10.1021/acsbiomaterials.0c00640

226. Dabaghi M, Shahriari S, Saraei N, et al. Surface Modification of PDMS-Based Microfluidic Devices with Collagen Using Polydopamine as a Spacer to Enhance Primary Human Bronchial Epithelial Cell Adhesion. *Micromachines (Basel)*. 2021;12(2):132. doi:10.3390/mi12020132

227. Tsuzuki T, Baassiri K, Mahmoudi Z, et al. Hydrophobic Recovery of PDMS Surfaces in Contact with Hydrophilic Entities: Relevance to Biomedical Devices. *Materials (Basel)*. 2022;15(6):2313. doi:10.3390/ma15062313

228. Ganta D, Marry C, Ma J, Sinha S. Hydrophobic recovery in ultrathin PDMS-coated long and short silicon nanowires. *Chemical Physics Letters*. 2016;647:175-180. doi:10.1016/j.cplett.2016.01.058

229. Borók A, Laboda K, Bonyár A. PDMS Bonding Technologies for Microfluidic Applications: A Review. *Biosensors (Basel)*. 2021;11(8):292. doi:10.3390/bios11080292

230. Akther F, Yakob SB, Nguyen NT, Ta HT. Surface Modification Techniques for Endothelial Cell Seeding in PDMS Microfluidic Devices. *Biosensors*. 2020;10(11):182. doi:10.3390/bios10110182

231. Ferrari E, Nebuloni F, Rasponi M, Occhetta P. Photo and Soft Lithography for Organ-on-Chip Applications. In: Rasponi M, ed. *Organ-on-a-Chip: Methods and Protocols*. Methods in Molecular Biology. Springer US; 2022:1-19. doi:10.1007/978-1-0716-1693-2_1

232. Alrifaiy A, Lindahl OA, Ramser K. Polymer-Based Microfluidic Devices for Pharmacy, Biology and Tissue Engineering. *Polymers*. 2012;4(3):1349-1398. doi:10.3390/polym4031349

233. Baka Z, Stiefel M, Figarol A, et al. Cancer-on-chip technology: current applications in major cancer types, challenges and future prospects. *Prog Biomed Eng*. 2022;4(3):032001. doi:10.1088/2516-1091/ac8259

234. Fleszar AJ, Walker A, Porubsky V, et al. The extracellular matrix of ovarian cortical inclusion cysts modulates invasion of fallopian tube epithelial cells. *APL Bioeng*. 2018;2(3):031902. doi:10.1063/1.5022595

235. de Almeida Monteiro Melo Ferraz M, Nagashima JB, Venzac B, Le Gac S, Songsasen N. A dog oviduct-on-a-chip model of serous tubal intraepithelial carcinoma. *Sci Rep*. 2020;10:1575. doi:10.1038/s41598-020-58507-4

236. Li SS, Ip CKM, Tang MYH, et al. Modeling Ovarian Cancer Multicellular Spheroid Behavior in a Dynamic 3D Peritoneal Microdevice. *J Vis Exp*. 2017;(120):55337. doi:10.3791/55337

237. Ibrahim LI, Hajal C, Offeddu GS, Gillrie MR, Kamm RD. Omentum-on-a-chip: A multicellular, vascularized microfluidic model of the human peritoneum for the study of ovarian cancer metastases. *Biomaterials*. 2022;288:121728. doi:10.1016/j.biomaterials.2022.121728

238. Flont M, Jastrzębska E, Brzózka Z. A multilayered cancer-on-a-chip model to analyze the effectiveness of new-generation photosensitizers. *Analyst*. 2020;145(21):6937-6947. doi:10.1039/D0AN00911C

239. Ip CKM, Li SS, Tang MYH, et al. Stemness and chemoresistance in epithelial ovarian carcinoma cells under shear stress. *Sci Rep*. 2016;6:26788. doi:10.1038/srep26788

240. Saha B, Mathur T, Handley KF, et al. OvCa-Chip microsystem recreates vascular endothelium–mediated platelet extravasation in ovarian cancer. *Blood Adv*. 2020;4(14):3329-3342. doi:10.1182/bloodadvances.2020001632

241. Conrad C, Moore K, Polacheck WJ, Rizvi I, Scarcelli G. Mechanical Modulation of Ovarian Cancer Tumor Nodules Under Flow. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*. 2022;69(1):294-301. doi:10.1109/TBME.2021.3092641

242. Del Piccolo N, Shirure VS, Bi Y, et al. Tumor-on-chip modeling of organ-specific cancer and metastasis. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2021;175:113798. doi:10.1016/j.addr.2021.05.008

243. Liu Y, Yang Q, Zhang H, et al. Construction of cancer-on-a-chip for drug screening. *Drug Discovery Today*. 2021;26(8):1875-1890. doi:10.1016/j.drudis.2021.03.006

244. Komen J, van Neerven SM, van den Berg A, Vermeulen L, van der Meer AD. Mimicking and surpassing the xenograft model with cancer-on-chip technology. *EBioMedicine*. 2021;66:103303. doi:10.1016/j.ebiom.2021.103303

245. Liu X, Su Q, Zhang X, et al. Recent Advances of Organ-on-a-Chip in Cancer Modeling Research. *Biosensors (Basel)*. 2022;12(11):1045. doi:10.3390/bios12111045

246. Regmi S, Poudel C, Adhikari R, Luo KQ. Applications of Microfluidics and Organ-on-a-Chip in Cancer Research. *Biosensors (Basel)*. 2022;12(7):459. doi:10.3390/bios12070459

247. Choi Y, Hyun E, Seo J, et al. A microengineered pathophysiological model of early-stage breast cancer. *Lab Chip*. 2015;15(16):3350-3357. doi:10.1039/C5LC00514K

248. Hassell BA, Goyal G, Lee E, et al. Human Organ Chip Models Recapitulate Orthotopic Lung Cancer Growth, Therapeutic Responses, and Tumor Dormancy In Vitro. *Cell Reports*. 2017;21(2):508-516. doi:10.1016/j.celrep.2017.09.043

249. Jiang L, Ivich F, Tahsin S, et al. Human stroma and epithelium co-culture in a microfluidic model of a human prostate gland. *Biomicrofluidics*. 2019;13(6):064116. doi:10.1063/1.5126714

250. Truong DD, Kratz A, Park JG, et al. A Human Organotypic Microfluidic Tumor Model Permits Investigation Of The Interplay Between Patient-Derived Fibroblasts And Breast Cancer Cells. *Cancer Res*. 2019;79(12):3139-3151. doi:10.1158/0008-5472.CAN-18-2293

251. Fridman IB, Kostas J, Gregus M, et al. High-throughput microfluidic 3D biomimetic model enabling quantitative description of the human breast tumor microenvironment. *Acta Biomater*. 2021;132:473-488. doi:10.1016/j.actbio.2021.06.025

252. Sobrino A, Phan DTT, Datta R, et al. 3D microtumors in vitro supported by perfused vascular networks. *Sci Rep*. 2016;6. doi:10.1038/srep31589

253. Aung A, Kumar V, Theprungsirikul J, Davey SK, Varghese S. An Engineered Tumor-on-a-Chip Device with Breast Cancer–Immune Cell Interactions for Assessing T-cell Recruitment. *Cancer Res*. 2020;80(2):263-275. doi:10.1158/0008-5472.CAN-19-0342

254. Drifka CR, Eliceiri KW, Weber SM, Kao WJ. A bioengineered heterotypic stroma-cancer microenvironment model to study pancreatic ductal adenocarcinoma. *Lab Chip*. 2013;13(19):3965-3975. doi:10.1039/c3lc50487e

255. Bradney MJ, Venis SM, Yang Y, Konieczny SF, Han B. A Biomimetic Tumor Model of Heterogenous Invasion in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Small*. 2020;16(10):e1905500. doi:10.1002/smll.201905500

256. Mollica H, Teo YJ, Tan ASM, et al. A 3D pancreatic tumor model to study T cell infiltration. *Biomater Sci*. 2021;9(22):7420-7431. doi:10.1039/d1bm00210d

257. Sgarminato V, Marasso SL, Cocuzza M, et al. PDAC-on-chip for in vitro modeling of stromal and pancreatic cancer cell crosstalk. *Biomater Sci*. 2022;10:1039. doi:10.1039/d2bm00881e

258. Liu P fei, Cao Y wei, Zhang S dong, et al. A bladder cancer microenvironment simulation system based on a microfluidic co-culture model. *Oncotarget*. 2015;6(35). doi:10.18632/oncotarget.6070

259. Buchanan CF, Verbridge SS, Vlachos PP, Rylander MN. Flow shear stress regulates endothelial barrier function and expression of angiogenic factors in a 3D microfluidic tumor vascular model. *Cell Adhesion & Migration*. 2014;8(5):517-524. doi:10.4161/19336918.2014.970001

260. Nguyen DHT, Lee E, Alimperti S, et al. A biomimetic pancreatic cancer on-chip reveals endothelial ablation via ALK7 signaling. *Sci Adv*. 2019;5(8). doi:10.1126/sciadv.aav6789

261. Ko J, Ahn J, Kim S, et al. Tumor spheroid-on-a-chip: a standardized microfluidic culture platform for investigating tumor angiogenesis. *Lab Chip*. 2019;19(17):2822-2833. doi:10.1039/C9LC00140A

262. Miller CP, Tsuchida C, Zheng Y, Himmelfarb J, Akilesh S. A 3D Human Renal Cell Carcinoma-on-a-Chip for the Study of Tumor Angiogenesis. *Neoplasia*. 2018;20(6):610-620. doi:10.1016/j.neo.2018.02.011

263. Guo Z, Song J, Hao J, et al. M2 macrophages promote NSCLC metastasis by upregulating CRYAB. *Cell Death Dis*. 2019;10(6):377. doi:10.1038/s41419-019-1618-x

264. Yu T, Guo Z, Fan H, et al. Cancer-associated fibroblasts promote non-small cell lung cancer cell invasion by upregulation of glucose-regulated protein 78 (GRP78) expression in an integrated bionic microfluidic device. *Oncotarget*. 2016;7(18):25593-25603. doi:10.18632/oncotarget.8232

265. Xu Z, Li E, Guo Z, et al. Design and Construction of a Multi-Organ Microfluidic Chip Mimicking the in vivo Microenvironment of Lung Cancer Metastasis. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2016;8(39):25840-25847. doi:10.1021/acsami.6b08746

266. Liu W, Song J, Du X, et al. AKR1B10 (Aldo-keto reductase family 1 B10) promotes brain metastasis of lung cancer cells in a multi-organ microfluidic chip model. *Acta Biomaterialia*. 2019;91:195-208. doi:10.1016/j.actbio.2019.04.053

267. Zheng L, Wang B, Sun Y, et al. An Oxygen-Concentration-Controllable Multiorgan Microfluidic Platform for Studying Hypoxia-Induced Lung Cancer-Liver Metastasis and Screening Drugs. *ACS Sens*. 2021;6(3):823-832. doi:10.1021/acssensors.0c01846

268. Jiang R, Huang J, Sun X, et al. Construction of in vitro 3-D model for lung cancer-cell metastasis study. *BMC Cancer*. 2022;22:438. doi:10.1186/s12885-022-09546-9

269. Kim H, Sa JK, Kim J, et al. Recapitulated Crosstalk between Cerebral Metastatic Lung Cancer Cells and Brain Perivascular Tumor Microenvironment in a Microfluidic Co-Culture Chip. *Adv Sci (Weinh)*. 2022;9(22):2201785. doi:10.1002/advs.202201785

270. Ao M, Brewer BM, Yang L, et al. Stretching Fibroblasts Remodels Fibronectin and Alters Cancer Cell Migration. *Sci Rep*. 2015;5. doi:10.1038/srep08334

271. Eslami Amirabadi H, Tuerlings M, Hollestelle A, et al. Characterizing the invasion of different breast cancer cell lines with distinct E-cadherin status in 3D using a microfluidic system. *Biomed Microdevices*. 2019;21(4). doi:10.1007/s10544-019-0450-5

272. Hao S, Ha L, Cheng G, et al. A Spontaneous 3D Bone-On-a-Chip for Bone Metastasis Study of Breast Cancer Cells. *Small*. 2018;14(12):1702787. doi:10.1002/smll.201702787

273. Azadi S, Tafazzoli Shadpour M, Warkiani ME. Characterizing the effect of substrate stiffness on the extravasation potential of breast cancer cells using a 3D microfluidic model. *Biotechnol Bioeng*. 2021;118(2):823-835. doi:10.1002/bit.27612

274. Crippa M, Talò G, Lamouline A, et al. A microfluidic model of human vascularized breast cancer metastasis to bone for the study of neutrophil-cancer cell interactions. *Mater Today Bio*. 2022;17:100460. doi:10.1016/j.mtbio.2022.100460

275. Conceição F, Sousa DM, Loessberg-Zahl J, et al. A metastasis-on-a-chip approach to explore the sympathetic modulation of breast cancer bone metastasis. *Mater Today Bio*. 2022;13:100219. doi:10.1016/j.mtbio.2022.100219

276. Cho HY, Choi JH, Kim KJ, Shin M, Choi JW. Microfluidic System to Analyze the Effects of Interleukin 6 on Lymphatic Breast Cancer Metastasis. *Front Bioeng Biotechnol*. 2021;8:611802. doi:10.3389/fbioe.2020.611802

277. Ahn J, Lim J, Jusoh N, et al. 3D Microfluidic Bone Tumor Microenvironment Comprised of Hydroxyapatite/Fibrin Composite. *Front Bioeng Biotechnol*. 2019;7. doi:10.3389/fbioe.2019.00168

278. Skardal A, Devarasetty M, Forsythe S, Atala A, Soker S. A Reductionist Metastasis-on-a-Chip Platform for In Vitro Tumor Progression Modeling and Drug Screening. *Biotechnol Bioeng*. 2016;113(9):2020-2032. doi:10.1002/bit.25950

279. Aleman J, Skardal A. A multi-site metastasis-on-a-chip microphysiological system for assessing metastatic preference of cancer cells. *Biotechnol Bioeng*. 2019;116(4):936-944. doi:10.1002/bit.26871

280. Wang Y, Wu D, Wu G, et al. Metastasis-on-a-chip mimicking the progression of kidney cancer in the liver for predicting treatment efficacy. *Theranostics*. 2020;10(1):300-311. doi:10.7150/thno.38736

281. Virumbrales-Muñoz M, Livingston MK, Farooqui M, Skala MC, Beebe DJ, Ayuso JM. Development of a Microfluidic Array to Study Drug Response in Breast Cancer. *Molecules*. 2019;24(23). doi:10.3390/molecules24234385

282. Chen Y, Gao D, Wang Y, Lin S, Jiang Y. A novel 3D breast-cancer-on-chip platform for therapeutic evaluation of drug delivery systems. *Analytica Chimica Acta*. 2018;1036:97-106. doi:10.1016/j.aca.2018.06.038

283. Chakrabarty S, Quiros-Solano WF, Kuijten MMP, et al. A Microfluidic Cancer-on-Chip Platform Predicts Drug Response Using Organotypic Tumor Slice Culture. *Cancer Res*. 2022;82(3):510-520. doi:10.1158/0008-5472.CAN-21-0799

284. Shen S, Zhang X, Zhang F, Wang D, Long D, Niu Y. Three-gradient constructions in a flow-rate insensitive microfluidic system for drug screening towards personalized treatment. *Talanta*. 2020;208:120477. doi:10.1016/j.talanta.2019.120477

285. Komen J, Westerbeek EY, Kolkman RW, et al. Controlled pharmacokinetic anti-cancer drug concentration profiles lead to growth inhibition of colorectal cancer cells in a microfluidic device. *Lab Chip*. 2020;20(17):3167-3178. doi:10.1039/D0LC00419G

286. Petreus T, Cadogan E, Hughes G, et al. Tumour-on-chip microfluidic platform for assessment of drug pharmacokinetics and treatment response. *Commun Biol*. 2021;4:1001. doi:10.1038/s42003-021-02526-y

287. Ong LJY, Chia S, Wong SQR, et al. A comparative study of tumour-on-chip models with patient-derived xenografts for predicting chemotherapy efficacy in colorectal cancer patients. *Front Bioeng Biotechnol*. 2022;10:952726. doi:10.3389/fbioe.2022.952726

288. Straehla JP, Hajal C, Safford HC, et al. A predictive microfluidic model of human glioblastoma to assess trafficking of blood–brain barrier-penetrant nanoparticles. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2022;119(23):e2118697119. doi:10.1073/pnas.2118697119

289. Chen J, Liu CY, Wang X, et al. 3D printed microfluidic devices for circulating tumor cells (CTCs) isolation. *Biosensors and Bioelectronics*. 2020;150:111900. doi:10.1016/j.bios.2019.111900

290. Neves M, Azevedo R, Lima L, et al. Exploring sialyl-Tn expression in microfluidic-isolated circulating tumour cells: A novel biomarker and an analytical tool for precision oncology applications. *New Biotechnology*. 2019;49:77-87. doi:10.1016/j.nbt.2018.09.004

291. Varillas JI, Zhang J, Chen K, et al. Microfluidic Isolation of Circulating Tumor Cells and Cancer Stem-Like Cells from Patients with Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Theranostics*. 2019;9(5):1417-1425. doi:10.7150/thno.28745

292. Kopac T. Protein corona, understanding the nanoparticle–protein interactions and future perspectives: A critical review. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2021;169:290-301. doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.12.108

293. Xu W, Xu M, Xiao Y, et al. Changes in target ability of nanoparticles due to protein corona composition and disease state. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2022;17(3):401-411. doi:10.1016/j.ajps.2022.03.002

294. Jeon NL, Dertinger SKW, Chiu DT, Choi IS, Stroock AD, Whitesides GM. Generation of Solution and Surface Gradients Using Microfluidic Systems. *Langmuir*. 2000;16(22):8311-8316. doi:10.1021/la000600b

295. Irimia D, Geba DA, Toner M. Universal Microfluidic Gradient Generator. *Anal Chem*. 2006;78(10):3472-3477. doi:10.1021/ac0518710

296. Orcheston-Findlay L, Hashemi A, Garrill A, Nock V. A microfluidic gradient generator to simulate the oxygen microenvironment in cancer cell culture. *Microelectronic Engineering*. 2018;195:107-113. doi:10.1016/j.mee.2018.04.011

Chapitre 2 : Matériel et méthodes

Introduction

Le but de ce chapitre est de décrire tout le matériel utilisé ainsi que la méthodologie appliquée dans le cadre de ce projet de thèse. Nous avons fait le choix de consacrer un chapitre entier aux aspects méthodologique car certains de ces aspects sont communs aux chapitres suivants.

Ce chapitre méthodologique est structuré autour des **trois axes expérimentaux développés dans les chapitres suivants (3 ; 4 et 5).**

- ✓ Etablissement et caractérisation d'un modèle d'une tumeur ovarienne par bio-impression 3D ;
- ✓ Evaluation de la réponse du modèle tumoral bio-imprimé à un agent thérapeutique : le cisplatine ;
- ✓ Intégration du modèle tumoral bio-imprimé au sein d'un système microfluidique.

Pour chacun de ces axes, nous allons commencer par décrire brièvement son objectif et les grandes phases qui le constituent. Ensuite, nous décririons en détail le matériel utilisé et les manipulations effectuées pour chacune de ces phases. Le but étant de permettre au lecteur de comprendre le contexte et le but des manipulations réalisées.

I. Etablissement d'un modèle d'une tumeur ovarienne par bio-impression 3D

Dans ce projet de thèse, la bio-impression 3D a été utilisée pour créer un modèle tridimensionnel d'une tumeur épithéliale ovarienne. **Pour ce faire, le travail a été organisé en quatre grandes étapes** :

1. Définition et optimisation de la composition qualitative et quantitative de la bio-encre à utiliser pour la bio-impression 3D ;
2. Conception et optimisation des fichiers informatiques nécessaires à la bio-impression 3D ;
3. Bio-impression des modèles tumoraux avec cellules ;
4. Caractérisation des modèles tumoraux.

Nous allons à présent décrire le matériel et la méthodologie appliqués dans le cadre de chacune de ces phases

I.1. Définition et optimisation de la composition de la bio-encre

Le terme « bio-encre » désigne les cellules ou le mélange (**cellules + molécules biocompatibles**) destinés à être bio-imprimé. Quand elles sont présentes, ces molécules biocompatibles sont généralement utilisées **sous la forme d'un hydrogel** dans lequel les cellules sont uniformément encapsulées. La composition qualitative et quantitative de cet hydrogel conditionne alors les propriétés rhéologiques et biologiques de la bio-encre obtenue.

Dans cette section, nous allons aborder la partie « hydrogel » de notre bio-encre. Nous verrons comment nous avons défini sa composition qualitative et quantitative. Le matériel et les réactifs utilisés dans cette phase sont décrits dans le Tableau 2.13.

Tableau 2.13. Matériel et réactifs utilisés dans la formulation de l'hydrogel

Réactif / Matériel	**Détails / Provenance**
Gélatine (**G**)	Gélatine de type B, origine bovine. Sigma-Aldrich, USA. (Réf : G9391)
Alginate de sodium (**SA**)	Sigma-Aldrich, USA. (Réf : W201502)
Milieu de culture Dulbecco's Modified Eagle Medium (**DMEM**)	

Sérum de Veau Fœtal (**SVF**)	Sigma-Aldrich, USA.
L-Glutamine	
Pénicilline / Streptomycine	
Amphotéricine B	
Bio-imprimante Bio-X	Bio-imprimante à extrusion à 3 têtes d'impression. CELLINK, USA

I.1.1. La composition qualitative de l'hydrogel

Pour la formulation de notre hydrogel, nous avons choisi d'utiliser une combinaison de deux matériaux : **la gélatine** et **l'alginate de sodium**. Le choix de ces deux matériaux sera discuté dans le 3ème chapitre de ce manuscrit de thèse.

Le **milieu de culture complet DMEM** a été utilisé comme **solvant** pour préparer les hydrogels au cours de la phase d'optimisation. La composition exacte de ce solvant est la suivante : milieu DMEM supplémenté avec 10% de SVF ; 2% de L-Glutamine ; 1% Pénicilline-Streptomycine et 0.05% Amphotéricine B. Le choix du solvant sera également discuté dans le 3ème chapitre.

I.1.2. La composition quantitative de l'hydrogel

Après avoir identifié les deux biomatériaux à utiliser, il fallait définir leurs **concentrations respectives** dans l'hydrogel. En effet, les concentrations en gélatine et alginate de sodium impactent **les propriétés rhéologiques** de l'hydrogel obtenu et donc son **imprimabilité**.

L'enjeu pour nous était de définir une formulation d'hydrogel permettant de satisfaire les critères suivants :

- ✓ Avoir une bonne imprimabilité à 37°C ;
- ✓ Être imprimable à une pression d'extrusion suffisamment faible pour réduire la contrainte de cisaillement imposée lors de l'impression. Idéalement, notre hydrogel devait pouvoir être imprimé à une pression inférieure ou égale à 20 kPa. Ce seuil a été fixé sur la base de données bibliographiques[1].

Pour atteindre cet objectif, nous avons établi une stratégie d'optimisation en 3 temps :

1. Préparer plusieurs solutions de gélatine et d'alginate de sodium ;

2. Observer le comportement de ces solutions à température ambiante ;
3. Effectuer des essais d'imprimabilité à 37°C.

➢ 1. Préparation des solutions

Deux groupes de solutions ont été préparées (10 mL par solution) (Tableau 2.14). Pour préparer chacune des solutions, les étapes suivantes ont été appliquées :

- ✓ Pesée des poudres de gélatine et d'alginate de sodium. Les masses pesées pour préparer 10 mL de chaque solution sont mentionnées dans le Tableau 2.14.
- ✓ Décontamination des poudres sous rayons ultra-violets pendant une heure ;
- ✓ Incorporation des poudres dans 10 mL de solvant ;
- ✓ Mise sous agitation magnétique à 37°C jusqu'à dissolution complète des poudres.

Tableau 2.14. Les différentes solutions préparées au cours de la phase d'optimisation de l'hydrogel

Groupe 1				**Groupe 2**			
Alginate de sodium		**Gélatine**		**Alginate de sodium**		**Gélatine**	
% (m/v)*	**Masse requise pour 10 mL de solution**	**% (m/v)**	**Masse requise pour 10 mL de solution**	**% (m/v)**	**Masse requise pour 10 mL de solution**	**% (m/v)**	**Masse requise pour 10 mL de solution**
1	0,1	1	0,1	2	0,2	1	0,1
1	0,1	3	0,3	2	0,2	3	0,3
1	0,1	5	0,5	2	0,2	5	0,5
1	0,1	7	0,7	2	0,2	7	0,7
1	0,1	9	0,9	2	0,2	9	0,9
1	0,1	11	1,1	2	0,2	11	1,1
1	0,1	13	1,3	2	0,2	13	1,3
1	0,1	15	1,5	2	0,2	15	1,5

* Le % (m/v) désigne le pourcentage masse/volume (soit la masse en grammes pour 100 mL de solution)

- **2. Observation du comportement des solutions à température ambiante**

Nous avons observé chacune des solutions préparées à température ambiante. Deux cas de figure pouvaient alors se présenter :

- ✓ Les solutions qui sont restées totalement liquides à température ambiante ont été éliminées car elles auraient été liquides et non imprimables à 37° ;
- ✓ Les solutions qui ont formé des gels à température ambiante ont été testées pour évaluer leur imprimabilité à 37°C ;

- **3. Evaluation de l'imprimabilité à 37°C**

Pour évaluer l'imprimabilité des solutions présélectionnées, nous avons procédé de la façon suivante :

- ✓ 3 mL de chaque solution ont été introduits dans une cartouche de bio-impression ;
- ✓ Un objet de forme carrée et de dimensions (10 x 10 x 1) mm a été imprimé avec chaque solution. L'imprimabilité a été évaluée via une comparaison visuelle avec le schéma théorique de l'objet imprimé. Les expériences ont été conduites à 37°C. Pour chaque essai d'impression, nous avons noté la pression minimale permettant une extrusion continue de matériau.

Ainsi, la formulation d'hydrogel donnant le meilleur résultat en termes d'imprimabilité à 37°C a été retenue pour la suite des expérimentations.

Remarque

Il faut savoir que cet objet carré ne correspond pas à la forme du modèle tumoral que nous voulions fabriquer. Cependant, il a été sélectionné car il permet une bonne appréciation visuelle de l'imprimabilité de chaque solution testée.

I.2. Conception et optimisation des fichiers informatiques nécessaires à la bio-impression

Le modèle tumoral que nous voulions imprimer **avait une forme cylindrique de 7 mm de diamètre et de 1,5 mm d'épaisseur**. Cette forme a été imaginée pour être intégrée dans le système microfluidique (qui sera décrit dans le 5ème chapitre de ce manuscrit).

Pour bio-imprimer le modèle tumoral avec la forme requise, nous avons procédé en deux temps :

1. Dans un premier temps, nous avons dessiné un objet 3D correspondant à la forme désirée et nous l'avons exporté sous forme d'un **fichier .stl**. Ce fichier a été intégré dans la base de données de la bio-imprimante et utilisé pour fabriquer les structures tumorales. Pour avoir ce fichier, nous avons utilisé la plateforme de Conception Assistée par Ordinateur (CAO) 3D Onshape. La bio-imprimante est équipée d'un logiciel lui permettant de transformer le fichier .stl en un fichier .gcode. Le fichier .gcode comprend plusieurs lignes de code indiquant notamment à la tête d'impression comment se déplacer pour fabriquer l'objet 3D ;

2. Dans un second temps, nous avons dû extraire et modifier le fichier .gcode généré par la bio-imprimante à partir du fichier .stl initial. Nous avons utilisé le logiciel **CAMotics** pour simuler les fichiers .gcode au cours de leur optimisation. Le logiciel Excel a été utilisé pour faire les calculs nécessaires à la génération des nouveaux fichiers .gcode. C'est un cheminement que nous allons expliquer plus en détail dans le 3ème chapitre de ce manuscrit.

Remarque

Le travail d'optimisation des supports informatiques a été réalisé en étroite collaboration avec Zoé Magne (Ingénieure de l'Ecole Nationale Supérieure des Industries Chimiques (ENSIC, Nancy) en stage de recherche et développement à l'Institut Jean Lamour en Mars 2021)).

I.3. Préparation des modèles bio-imprimés

Les deux phases précédentes nous ont permis d'obtenir un hydrogel imprimable et un fichier informatique approprié (c'est-à-dire permettant d'avoir une structure à la forme et aux dimensions désirées). L'étape suivante était donc de produire notre **modèle tumoral avec cellules**. C'est ce que nous allons décrire dans cette partie.

I.3.1. Réactifs et matériel utilisé

Les caractéristiques et la provenance des réactifs utilisés durant cette phase sont récapitulés dans le Tableau 2.15. Noter que certains produits déjà mentionnés dans le Tableau 2.14 sont repris ici car ils ont aussi été utilisés dans cette phase. Nous avons fait le choix de les reprendre dans ce tableau pour permettre une lecture plus agréable du document.

Tableau 2.15. Matériel et réactifs utilisés dans la préparation des modèles tumoraux contenant des cellules

Réactif / Matériel	**Caractéristiques / Provenance**
Lignée cellulaire SKOV-3	Lignée cancéreuse issue de l'ascite d'une patiente ayant un adénocarcinome ovarien. Obtenue auprès de Sigma-Aldrich, USA.
Lignée cellulaire MeWo	Lignée fibroblastique issue d'une métastase d'un mélanome malin. Obtenu auprès de l'American Type Culture Collection (ATCC), USA.
Milieu de culture Dulbecco's Modified Eagle Medium (**DMEM**)	Sigma-Aldrich, USA.
Milieu de culture Minimal Essential Medium (**MEM**)	
Sérum de Veau Fœtal (**SVF**)	
L-Glutamine	
Pénicilline / Streptomycine	
Amphotéricine B	
Solution Trypsine / EDTA (acide Éthylènediaminetétraacétique)	
Pyruvate de sodium	
Tampon phosphate salin (phosphate-buffered saline ou **PBS** en anglais)	
Gélatine (**G**)	Gélatine de type B, origine bovine. Sigma-Aldrich, USA.
Alginate de sodium (**SA**)	Sigma-Aldrich, USA.

Chlorure de calcium ($CaCl_2$)	Sigma-Aldrich, USA.
Citrate de sodium	Sigma-Aldrich, USA.
Bio-imprimante Bio-X	Bio-imprimante à extrusion à 3 têtes d'impression. CELLINK, USA

I.3.2. Lignées cellulaires et culture cellulaire

Dans notre modèle **d'une tumeur épithéliale ovarienne**, nous avons choisi de combiner 2 types cellulaires :

- ✓ Les cellules cancéreuses ovariennes de la lignée SKOV-3 ;
- ✓ Les fibroblastes cancéreux de la lignée MeWo.

Le choix de ces deux lignées cellulaires sera justifié et discuté dans le 3ème chapitre de ce manuscrit.

Les modalités de culture des cellules sont les suivantes :

- ✓ Les cellules SKVO3 ont été cultivées dans le milieu DMEM supplémenté avec 10% de SVF ; 2% de L-Glutamine ; 1% de Pénicilline / Streptomycine et 0,05% d'amphotéricine B. Elles ont été mises en culture dans des flasques T75 à 37°C et 5% de CO_2. Elles ont été passées deux fois par semaine ;
- ✓ Les cellules MeWo ont été cultivées dans le milieu MEM supplémenté avec 10% de SVF ; 2% de L-Glutamine ; 1% de Pénicilline / Streptomycine ; 0,05% d'amphotéricine B et 1mM de pyruvate de sodium. Elles ont été mises en culture dans des flasques T75 à 37°C et 5% de CO_2. Elles ont été passées deux fois par semaine.

Ces modalités de culture cellulaires ont été appliquées tout au long de ce projet de thèse. Les cellules ont par ailleurs été régulièrement testées pour s'assurer de l'absence des contaminations aux mycoplasmes. Les tests ont été effectués tous les 3 mois environ en utilisant le kit EASY-MYCO-TEST® (Axiotis, France).

I.3.3. Préparation des structures bio-imprimées contenant des cellules

- ➢ **Composition des bio-encres utilisées pour la bio-impression**

Avant de décrire en détail les manipulations effectuées pour la bio-impression, nous devons fournir des précisions concernant la composition de les bio-encre utilisées.

La concentration en gélatine et alginate de sodium

Nous avons utilisé les concentrations ayant été fixées à l'issue de la phase d'optimisation de l'hydrogel. Nous donnerons les valeurs numériques dans le 3ème chapitre de ce manuscrit de thèse.

La composition en cellules

Comme mentionné précédemment, nous avons opté pour un modèle **en coculture** contenant les cellules SKOV-3 et les cellules MeWo. Nous avons incorporé ces deux types cellulaires dans notre hydrogel à un ratio de 1:1 (50% de SKOV-3 et 50% de MeWo). Nous avons ainsi obtenu une **bio-encre bicellulaire** que nous noterons **bio-encre S+M**. La concentration totale en cellules y a été fixée à 10^6 Cell. / mL (donc 0,5 x 10^6 / mL en SKOV-3 et 0,5 x 10^6/ mL en MeWo).

Pour les besoins de certaines expérimentations, nous avons également dû bio-imprimer des structures contenant **un seul type cellulaire** (pour s'en servir de contrôles ou pour effectuer des comparaisons avec la coculture). Pour cela, des **bio-encres monocellulaires** ont été préparées : (i) La bio-encre S contenant des SKOV-3 uniquement et la bio-encre M contenant des MeWo uniquement. La concentration en cellules de ces bio-encres monocellulaires a été ajustée en fonction des besoins spécifiques de chaque expérience dans laquelle elles ont été utilisées (soit 10^6 Cell. / mL ou 0,5 x 10^6 Cell. / mL). Les concentrations en cellules de ces bio-encres monocellulaires seront indiquées dans chaque partie où elles ont été utilisées.

La composition en solvant

Par « solvant », nous désignons le liquide ayant été utilisé pour solubiliser la gélatine et l'alginate de sodium en vue de la préparation de l'hydrogel.

Rappelons que durant la phase d'optimisation, c'est le milieu de culture complet DMEM qui a été utilisé comme solvant. Ensuite pour préparer les structures avec cellules, nous avons dû adapter le solvant en fonction de la composition cellulaire de la bio-encre. Tout cela est résumé dans le Tableau 2.15.

Tableau 2.16. Composition des bio-encres utilisées dans cette étude.

Bio-encre considérée	Composition en cellules (/ mL de bio-encre)	Composition en solvant
La bio-encre bicellulaire S+M	0,5 x 10^6 / mL en SKOV-3 + 0,5 x 10^6 / mL en MeWo	Milieu DMEM complet* + milieu MEM complet (à un ration de 1:1)
La bio-encre monocellulaire S	0,5 x 10^6 / mL ou 1 x 10^6 / mL en SKOV-3 (en fonction des expérimentations)	Milieu DMEM complet
La bio-encre monocellulaire M	0,5 x 10^6 / mL ou 1 x 10^6 / mL de MeWo (en fonction des expérimentations)	Milieu MEM complet

* Milieu complet = milieu supplémenté en SVF et tous les autres additifs tel qu'indiqué dans le titre I.3.2.

- **Vérifications effectuées avant de fixer la composition des bio-encres**

Avant de fixer la composition des bio-encres telle que mentionnée dans le Tableau 2.15, nous avons effectué quelques vérifications. Nous résumons cela à travers les points suivants :

Impact du solvant sur l'imprimabilité

Nous avons dû nous assurer que le remplacement du milieu DMEM par le milieu MEM ou le mélange (DMEM + MEM) n'avait pas d'impact sur l'imprimabilité de l'hydrogel. Nous nous sommes par ailleurs assurés que les paramètres d'impression définis lors de la phase d'optimisation étaient applicables pour ces 3 solvants.

Cohabitation des deux types cellulaires

Les deux types cellulaires (SKOV-3 et MeWo) étaient destinés à être mélangés dans la bio-encre S+M et dans les structures bio-imprimées. Nous avons donc fait des essais de coculture en 2D pour observer le comportement respectif des deux types cellulaires. Pour ce faire, des cellules SKOV-3 et des cellules MeWo ont été mélangées (ration 1:1) et mises en culture ensemble dans du milieu cocktail (DMEM + MEM). La morphologie et le comportement des 2 types cellulaires ont ensuite été observés jusqu'au 7ème jour après mise en culture. A ce niveau, il convient d'indiquer que les SKOV-3 et les MeWo présentent des morphologies différentes

et peuvent être distinguées en microscopie optique. A travers cette manipulation, nous voulions savoir si les deux populations cellulaires restaient mélangées ou si elles avaient tendance à se séparer en coculture.

- **Les étapes de fabrication des structures bio-imprimées**

Pour préparer les modèles tumoraux contenant les cellules, nous avons construit une manipulation en 4 temps :

1. Préparation des hydrogels (gélatine + alginate de sodium + solvant) ;
2. Trypsination des cellules et préparation des suspensions cellulaires ;
3. Incorporation des suspensions cellulaires dans l'hydrogel et bio-impression ;
4. Réticulation des structures bio-imprimées et mise en culture à 37°C et 5% de CO_2.

Au cours de chaque manipulation de bio-impression, nous préparions un volume total de **5 mL de bio-encre**. A partir de ce volume, **3 mL** sont utilisés pour charger une cartouche de bio-impression. Une cartouche de **3 mL** est suffisante pour produire **48 structures** bio-imprimées.

Remarque : Pourquoi préparer 5 mL alors que nous n'utilisons que 3 mL ?

La mise en place de cette grande marge de 2 mL est nécessaire pour pallier des contraintes techniques. Lorsque la bio-encre est chargée dans la cartouche de bio-impression, nous avons des pertes liées à la présence d'un barreau aimanté dans le flacon de préparation. En plus, la bio-encre adhère aux parois du flacon. Par ailleurs, la cartouche est chargée par aspiration de la bio-encre. Ce volume excédentaire est donc nécessaire pour être sûr de récupérer 3 mL tout en évitant l'aspiration de bulles d'air.

Nous allons maintenant décrire chacune des 4 étapes évoquées ci-dessus.

Préparation des hydrogels (gélatine + alginate de sodium + solvant)
Les hydrogels sont préparés de la même manière que durant la phase d'optimisation. Les poudres de gélatine et d'alginate de sodium sont pesées puis décontaminées par passage sous rayons ultra-violets pendant 1 heure. Elles sont ensuite incorporées dans le solvant dans des récipients stériles en verre. Les solutions obtenues sont soumises à une agitation magnétique à 37°C jusqu'à dissolution complète des poudres.

Trypsination des cellules et préparation des suspensions cellulaires

Les cellules, en culture dans des flasques T75, sont récupérées par trypsination (Action d'une solution Trypsine – EDTA pendant 4 minutes puis inhibition par un excès de SVF). Les cellules sont ensuite comptées. Enfin, des suspensions contenant le nombre de cellules suffisant pour **5 mL** de bio-encre sont préparées.

Incorporation des suspensions cellulaires dans l'hydrogel et bio-impression

Lorsque les suspensions cellulaires sont prêtes, les hydrogels (encore sous agitation à 37°C) sont récupérés. Les suspensions cellulaires y sont incorporées. Une homogénéisation par agitation délicate est ensuite effectuée.

On procède ensuite au chargement de la cartouche d'impression avec 3 mL de bio-encre. La cartouche chargée est maintenue à température ambiante pendant 15 minutes avant d'être installée dans la bio-imprimante. A partir de là, la bio-impression proprement dite peut commencer. Une cartouche de 3 mL permet de préparer 48 structures environ. Chaque structure ayant une forme cylindrique de 1,5 mm d'épaisseur et de 7 mm de diamètre.

Nos modèles tumoraux sont imprimés dans des plaques 24 puits. La mise en culture et les expériences de caractérisation sont également effectuées dans des plaques 24 puits (sauf mention du contraire).

La bio-imprimante est équipée d'une interface (un écran) permettant de fixer les paramètres d'impression. Dans le cadre de nos manipulations, les paramètres suivants ont été appliqués (Tableau 2.17).

Tableau 2.17. Les paramètres appliqués pour la bio-impression des modèles tumoraux

Paramètre	**Valeur appliquée et unité**
Diamètre interne de l'aiguille d'impression	23G = 0,60 mm
Longueur de l'aiguille d'impression	12,7 mm
Pression d'extrusion	10 – 20 kPa
Vitesse de déplacement de l'aiguille d'impression	4 à 5 mm/s
Température de la tête d'impression	37°C

Température du lit d'impression	8°C

Après avoir bio-imprimer les structures tumorales, elles sont réticulées puis mises en culture. C'est ce qu'on décrit dans la prochaine étape.

Réticulation et mise en culture

En bio-impression, la réticulation désigne l'ensemble des méthodes permettant aux objets bio-imprimées de maintenir leur forme et leur structure sur la durée de mise en culture. Dans notre étude, nous avons choisi une méthode de réticulation chimique : le traitement par une solution de chlorure de calcium ($CaCl_2$).

- ❖ Principe de la réticulation au chlorure de calcium ($CaCl_2$)

Le principe de cette méthode est le suivant (Figure 2.23) : Les ions Ca^{2+} (divalents) ont la capacité de créer des ponts intermoléculaires entre les molécules d'alginate. En effet, Ils interagissant simultanément avec des groupements COO^- présents sur 2 molécules d'alginate différentes. Ainsi, on observe la formation d'un réseau moléculaire d'alginate de calcium. Ce réseau permet aux structures bio-imprimées de maintenir leur forme lors de la mise en culture à 37°C.

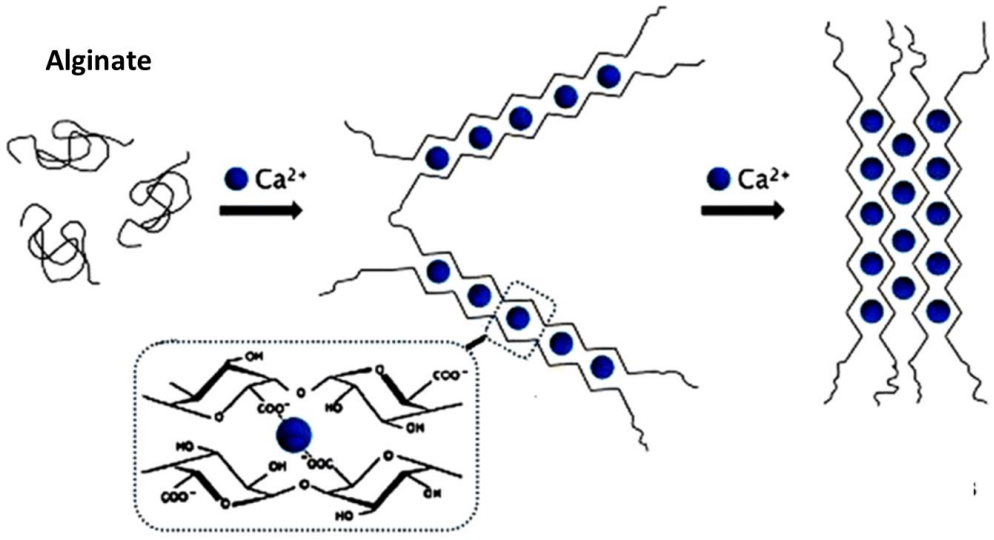


Figure 2.23. Principe de la réticulation de l'alginate en présence d'ions calcium[2].

❖ Application de cette méthode de réticulation à nos structures bio-imprimées

Après bio-impression, chaque structure (dans un puits d'une plaque 24 puits) est supplémentée avec 500 µL d'une solution de $CaCl_2$ à 100 mM. Après 7 minutes, les structures sont rincées une fois avec du milieu complet frais pour éliminer le $CaCl_2$.

Remarque : pourquoi utiliser une concentration de 100 mM de $CaCl_2$ pour la réticulation ?

- ✓ Pour éviter de soumettre les cellules à un choc osmotique, il faut que la solution de réticulation soit isotonique (C'est-à-dire ayant la même osmolarité que le milieu extracellulaire humain) ;
- ✓ L'osmolarité du milieu extracellulaire humain est de l'ordre de 300 mosmol/L^3 ;
- ✓ La solution de $CaCl_2$ de 100 mM (soit 100 mmol/L) a une osmolarité de 300 mosoml/L. Elle est donc isotonique.

Après réticulation et rinçage, on procède à **la mise en culture** des structures bio-imprimées. Pour cela, chaque structure est supplémentée avec 1 mL de milieu complet. Le milieu utilisé dépend de la composition cellulaire des bio-encres (Tableau 2.18). Les plaques contenant les structures sont mises en culture à 37°C et à 5% de CO_2 jusqu'au moment de les utiliser pour les différentes expérimentations. Le milieu est renouvelé chaque 2 à 3 jours.

Tableau 2.18. Composition du milieu de culture en fonction de la bio-encre utilisée

Bio-encre utilisée pour la bio-impression	**Composition cellulaire de la bio-encre**	**Milieu utilisé pour la mise en culture des structures**
S+M	SKOV-3 + MeWo	Milieu DMEM complet + milieu MEM complet (à un ration de 1:1)
S	SKOV-3	Milieu DMEM complet
M	MeWo	Milieu MEM complet

Remarque

Ce protocole de bio-impression a été appliqué pour toutes les expérimentations nécessitant de préparer des structures bio-imprimées. Il est commun aux 3ème, 4ème et 5ème chapitres de ce manuscrit de thèse.

I.4. Caractérisations biologiques des modèles bio-imprimés

Dans cette partie nous allons décrire l'ensemble des protocoles visant à caractériser les structures bio-imprimées. Ces études sont essentiellement relatives au 3ème chapitre de ce manuscrit. Néanmoins, certains protocoles ont également été appliqués dans le cadre des 4ème et du 5ème chapitres.

I.4.1. Evaluation de la viabilité cellulaire

Le maintien de la viabilité cellulaire est un enjeu clé au cours de la bio-impression par extrusion. Pour évaluer la viabilité des structures bio-imprimées, nous avons d'abord opté pour la technique « Live/Dead » associée à l'imagerie en microscopie confocale.

- **Principe de la technique Live/Dead**

Le principe de cette technique repose d'une part sur la détection de l'activité estérase caractérisant les cellules vivantes et d'autre part sur l'évaluation de l'intégrité membranaire. Elle fait intervenir deux réactifs :

- ✓ La calcéine-acetoxtméthyle (**calcéine-AM**) : molécule **non fluorescente** qui peut franchir les membranes cellulaires par diffusion à travers la bicouche phospholipidique. Une fois à l'intérieur des cellules, la calcéine-AM subit l'action des estérases cytoplasmiques présentes **uniquement dans les cellules vivantes**. Les estérases cytoplasmiques convertissent la calcéine-AM en **calcéine** qui est une molécule poly-anionique bien retenue dans les cellules. Par ailleurs, la calcéine émet une fluorescence verte intense ;
- ✓ L'éthidium homodimère 1 (EthD-1) : molécule qui traverse uniquement les membranes cellulaires endommagées des cellules mortes. Elle interagit ensuite avec les acides nucléiques de ces cellules pour générer un composé fortement fluorescent en rouge.

De cette manière, la technique Live/Dead permet donc de distinguer les cellules vivantes des cellules mortes. Les cellules vivantes donnent une fluorescence verte alors que les cellules mortes donnent une fluorescence rouge.

- **Application de la technique Live/Dead à nos structures bio-imprimées**

Le kit (Live/Dead™ pour viabilité et cytotoxicité des cellules de mammifères ; Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, USA) a été utilisé dans le cadre de cette étude. Le protocole de traitement des structures bio-imprimées a été construit sur la base des instructions du fabricant. Les étapes suivantes ont été appliquées :

- ✓ Elimination du milieu de culture de chaque structure ;
- ✓ Rinçage des structures 3 fois avec 1 mL de PBS ;
- ✓ Traitement de chaque structure par 500 µL d'une solution à 4 µM de calcéine-AM et 16 µM d'EtHD-1 (les réactifs ont été dilués dans du PBS) ;
- ✓ Incubation pendant 40 minutes à 37°C et à l'abri de la lumière ;
- ✓ Observation des structures au microscope confocal à fluorescence (Zeiss LSM 710, Heidelberg, Allemagne) en sélectionnant les filtres appropriés.

L'expérience a été réalisée à J+1, J+4 et J+7 après bio-impression (J pour jour). Pour chaque point de temps, Au moins 4 structures différentes ont été observées. Un contrôle négatif (**structures où les cellules ont été tuées**) a par ailleurs été préparé et observé pour chaque point de temps. Pour avoir ce contrôle négatif, des structures bio-imprimées ont été exposées à du méthanol à 70% pendant 30 minutes avant d'être traitées par les réactifs du kit Live/Dead.

Trois expériences indépendantes ont été réalisées. Plusieurs étapes d'optimisation ont par ailleurs été nécessaires notamment pour fixer les concentrations à utiliser en calcéine-AM et EthD-1.

I.4.2. Evaluation de l'activité métabolique des cellules au sein des structures bio-imprimées

En complément de la technique Live/Dead, nous avons mesuré l'activité métabolique des cellules au sein des structures bio-imprimées. Le but étant d'avoir une évaluation quantitative de la viabilité cellulaire. Pour ce faire, nous avons utilisé 2 techniques : la technique Water Soluble Tertrazolium 1 ou **WST-1** et la technique **AlamarBlue**.

- **Principe de la technique WST-1**

La technique WST-1 permet de mesurer l'activité métabolique des cellules. Le réactif WST-1 (un sel de tértrazolium de couleur rose clair) est converti en formazan (jaune orangé) par la succinate-réductase mitochondriale. Celle-ci est active dans les cellules vivantes et pas dans les cellules mortes. La conversion de WST-1 en formazan est donc directement corrélée à l'activité métabolique des cellules et à leur viabilité.

Après incubation du réactif WST-1 avec la population cellulaire, la quantité de formazan produite dans le milieu peut être quantifiée par mesure de l'absorbance à 450 nm.

- **Principe de la technique AlamarBlue**

Le principe de la technique AlamarBlue est très similaire à celui de la technique WST-1. Ici, le réactif utilisé est de la résazurine (molécule de couleur bleue, non fluorescente). Celle-ci est réduite en résorufine (molécule de couleur rouge, intensément fluorescente) par l'équipement enzymatique des cellules vivantes. La concentration de résorufine dans le milieu est donc directement proportionnelle au niveau d'activité métabolique des cellules et à leur niveau de viabilité. Elle peut être quantifiée par une mesure d'absorbance ou de fluorescence.

- **Application de ces deux techniques à nos structures bio-imprimées**

Ces techniques sont essentiellement conçues pour être utilisées sur des cellules cultivées en monocouche dans des plaques à puits. Dans ces conditions, l**es cellules sont en contact direct avec le réactif** (dilué dans le milieu de culture). Le produit coloré (formazan ou résorufine) est aussi libéré par les cellules directement dans le milieu.

Par contre, dans nos structures, les cellules sont incluses dans la matrice (gélatine – alginate). Elles ne sont donc pas en contact direct avec les réactifs WST-1 ou AlamarBlue.

Nous avons donc dû réfléchir à la façon d'adapter ces techniques à nos structures bio-imprimées.

Au cours de ce projet, nous avons été amenés à tester deux protocoles différents :

1. Un protocole avec élimination de la matrice **avant** exposition au réactif (WST-1 ou AlamarBlue) ;
2. Un protocole avec élimination de la matrice **après** exposition au réactif (WST-1 ou AlamarBlue).

Nous raconterons ce cheminement de manière détaillée dans le 3ème chapitre de ce manuscrit. En attendant, nous allons expliquer et décrire chacun des deux protocoles mis en œuvre.

*Le protocole avec élimination de la matrice **avant** exposition au réactif*
L'idée derrière ce protocole était simple. La matrice (gélatine – alginate) devait être éliminée (dissoute) afin de récupérer les cellules qui y sont incluses. Les cellules pouvaient alors être réensemencées dans des plaques à puits et exposées aux réactifs (WST-1 ou AlamarBlue). (En l'occurrence, nous n'avons appliqué ce protocole qu'avec la technique WST-1).

Pour éliminer (dissoudre) la matrice (gélatine – alginate), des sources bibliographiques préconisent l'utilisation de citrate de sodium à 55 mM (soit environ 1,5% en (m/v))[4]. Le citrate agit comme un chélateur. Il forme un complexe avec les ions Ca^{2+}. Ceux-ci ne maintiennent donc plus les molécules d'alginate ensemble. La matrice passe alors à l'état liquide après incubation à 37°C.

Pour mettre en pratique ce protocole, nous avons exécuté les étapes suivantes :

- ✓ Elimination des matrices des structures bio-imprimées par traitement avec 400 µL de citrate de sodium à 1,5% pendant 1h15 minutes à 37°C ;
- ✓ Après dissolution de la matrice, les solutions obtenues ont été transférées dans des plaques 96 puits à raison de 100 µL / puits ;
- ✓ Traitement par le réactif WST-1 (10 µL de réactif par puits)
- ✓ Incubation pendant 2 heures à 37°C ;
- ✓ Lecture de l'absorbance à 450 nm.

Pour définir **un contrôle positif**, l'activité métabolique de cellules en monocouche (10^4 cellules / puits dans des plaques 96 puits) a par ailleurs été évaluée via la technique WST-1. L'absorbance obtenue à J+1 a été définie comme équivalente à 100% de viabilité cellulaire.

Comme le citrate de sodium a été utilisé pour dissoudre la matrice des structures 3D, nous avions décidé d'évaluer sa toxicité. Pour ce faire, des cellules en monocouche (10^4 cellules / puits dans des plaques 96 puits) ont été exposées au citrate de sodium sur la même durée que les structures 3D (1h15 minutes). L'activité métabolique de ces cellules a ensuite été mesurée via la technique WST-1. Elle a été exprimée en pourcentage de viabilité cellulaire par rapport au contrôle positif.

Nous avons également déterminé le nombre moyen de cellules par structure bio-imprimée. Pour ce faire, 6 structures ont été traitées au citrate de sodium. Le nombre de cellules dans les solutions obtenues a ensuite été déterminé par comptage au bleu trypan. Ainsi, nous avons pu connaitre le nombre moyen de cellules ayant été exposées au réactif WST-1 après dissolution des structures bio-imprimées.

Dans le cadre de ce protocole, les résultats ont été exprimés en pourcentage de viabilité cellulaire en prenant **l'absorbance des cellules en 2D au 1er jour comme valeur équivalente à 100%**. **La différence en nombre de cellules entre les puits 2D et ceux issus des structures 3D a été prise en considération** : pour déterminer la valeur d'absorbance équivalente à 100% de viabilité cellulaire en 3D, la valeur référence en 2D a été multipliée par le ratio (**nombre de cellules en 3D / nombre de cellules en 2D**).

Ce protocole n'a été appliqué qu'à seul réplica biologique. Nous verrons pourquoi dans le 3ème chapitre de ce manuscrit.

*Le protocole avec élimination de la matrice **après** exposition au réactif*
Le concept de ce protocole est fondamentalement différent du précédent. Ici, les structures bio-imprimées sont exposées au réactif (WST-1 ou AlamarBlue) en tant que telles (sans dissoudre la matrice). Le réactif doit alors diffuser à travers la masse (gélatine-alginate) pour être métabolisé par les cellules qui y sont encapsulées. De la même façon, le produit coloré issu de la conversion du réactif (formazan ou résorufine) se retrouve d'abord dans la matrice avant de diffuser vers le milieu de culture.

Pour mettre en place ce protocole, nous avons imaginé une manipulation en deux temps :

1. Incubation des structures bio-imprimées en présence du réactif : Nous avons dû r**allonger le temps d'incubation pour permettre la diffusion du réactif dans la matrice**. Au lieu des 1 à 2 heures préconisées pour les expériences en 2D, nous avons fixé un temps d'incubation de 5 heures ;
2. **Dissolution de la matrice pour permettre la libération du produit coloré**. En effet, à l'issue de la période d'incubation de 5 heures, on constate que les structures bio-imprimées prennent la couleur du produit de la réaction (jaune orangé pour le formazan ou rouge pour la résorufine). Nous avons alors décidé de dissoudre les matrices pour récupérer un maximum de ce produit coloré.

Donc dans ce protocole, la métabolisation du réactif se déroule dans la matrice. L'élimination de cette dernière à l'issue de la phase d'incubation ne sert qu'à libérer le produit coloré. Celui-ci se retrouve alors en solution ce qui permet de quantifier sa concentration par mesure de l'absorbance ou de la fluorescence.

Sur le plan pratique, le protocole a été exécuté à travers les étapes suivantes :

- ✓ Elimination du milieu de culture des structures bio-imprimées ;
- ✓ Traitement de chaque structure par 500 µL de la solution de réactif (WST-1 ou AlamarBlue dilués à 10% (v/v) dans le milieu de culture) ;
- ✓ Incubation pendant 5 heures à 37°C ;
- ✓ Addition, à chaque structure, de 500 µL de citrate de sodium à 1,5% (m/v) ;
- ✓ Incubation pendant 30 minutes pour permettre la dissolution de la matrice ;
- ✓ La solution obtenue à partir de chaque structure est alors transférée dans une plaque 96 puits (100 µL / puits et 4 puits pour chaque structure) ;
- ✓ Lecture de l'absorbance à 450 nm (pour le formazan issu du WST-1) ;
- ✓ Lecture de la fluorescence ($\lambda_{Ex}/\lambda_{Em}$ = 544/590 nm) pour la résorufine issue du réactif AlamarBlue.

L'expérience a été réalisée à J+1 ; J+3 et J+7 après bio-impression. Au moins 3 structures différentes ont été traitées pour chaque point de temps. Trois expériences indépendantes ont par ailleurs été conduites.

Un contrôle négatif (**structures où les cellules ont été tuées**) a par ailleurs été préparé et traité pour chaque point de temps. Pour avoir ce contrôle négatif, des structures bio-imprimées ont été exposées à du méthanol à 70% pendant 30 minutes avant d'être traitées par le réactif (WST-1 ou AlamarBlue) comme indiqué ci-dessus.

Bien entendu, Il fallait également quantifier l'éventuelle absorbance et/ou fluorescence associée(s) à la matrice et au citrate de sodium. Nous avons donc préparé **des blancs**. Pour ce faire, des structures sans cellules ont été bio-imprimées. Elles ont été traitées exactement dans les mêmes conditions que les modèles tumoraux avec cellules. Les valeurs d'absorbance ou de fluorescence issues des puits « blancs » ont eté utilisées pour calculer une « valeur blanc moyenne ». Cette vaeur a ensuite été soustraite aux valeurs mesurées sur les puits « réactifs ».

Pour cette manipulation, les résultats ont été exprimés par la moyenne ± écart-type d'absorbance ou de fluorescence (unités arbitraires) pour chaque point de temps. Cette moyenne a été calculée sur les 3 expériences indépendantes réalisées.

Remarque

Il est à noter que ce protocole (dissolution de la matrice **après** exposition au réactif) a également été appliqué dans le cadre des 4ème et 5ème chapitre de ce manuscrit de thèse.

I.4.3. Distribution spatiale des cellules au sein des structures bio-imprimées

Pour visualiser la distribution des cellules au sein des structures bio-imprimées, nous avons eu recours à l'approche suivante : Les deux types cellulaires (SKOV-3 et MeWo) ont été marqués différemment avant d'être utilisés pour préparer des structures bio-imprimées. Ces dernièresont ensuite été observées en microscopie confocale à fluorescence.

Les cellules SKOV-3 ont été transfectées pour exprimer la GFP (protéine fluorescente verte ou Green Fluorescent Protein en anglais). Pour cela, nous avons utilisé le kit de transfection JetOPTIMUS®. Celui-ci nous été gracieusement offert par l'entreprise Polyplus Transfection Company (France). La transfection a été effectuée conformément aux instructions du fabricant. Les étapes suivantes ont été exécutées :

- ✓ Mise en culture des cellules SKOV-3 dans une flasque T75 pour atteindre 60% à 80% de confluence ;
- ✓ Préparation de la solution de transfection en combinant 1 mL de tampon, 10 µg d'ADN et 10 µL de réactif de transfection ;
- ✓ Maintien de la solution de transfection à température ambiante pendant 10 minutes ;
- ✓ Introduction progressive (goutte à goutte) de la solution de transfection dans le milieu de culture de la flasque de SKOV-3 préalablement préparée ;
- ✓ Le jour suivant, les cellules ont été récupérées par trypsination et utilisées pour la bio-impression.

Les cellules MeWo ont été marquées par le **CellTracker™ Orange CMRA** (Thermo Fisher Scientific, USA). Ce réactif nous a été gracieusement offert par la Docteure De Isla N. (Ingénierie Moléculaire et Physiopathologie Articulaire (IMoPA), Nancy, France). Les cellules ont été traitées conformément aux instructions du fabricant. Les étapes suivantes ont été exécutées.

- ✓ Culture des cellules MeWo dans une flasque T25 ;
- ✓ Préparation d'une solution à 20 µM de CellTracker™ Organe CMRA. Le réactif en poudre a été solubilisé dans 9 µL de DMSO avant d'être dilué dans 5 mL de milieu de culture MEM sans SVF ;
- ✓ Retrait du milieu de culture des cellules (sur la T25) ;
- ✓ Introduction de la solution de réactif et incubation à 37°C pendant 30 minutes ;
- ✓ Retrait de la solution de réactif et supplémentation avec du milieu de culture complet ;
- ✓ Le jour suivant, les cellules ont été récupérées par trypsination et utilisées pour la bio-impression.

Les structures ont été observées au microscope confocal à fluorescence (Zeiss LSM 710, Heidelberg, Allemagne) à J+1 après bio-impression.

Pour les besoins du 4ème chapitre, ces images obtenues par microscopie confocale ont été exploitées pour effectuer une quantification des 2 types cellulaires. Ceci a été réalisé *via* un traitement informatique avec le logiciel ImageJ.

Remarque

Toutes les manipulations d'imagerie en microscopie confocale et les traitements informatiques associés ont été effectuées en collaboration avec la docteure Varvara Gribova au sein de l'équipe du Professeur Philippe Lavale (Centre de recherche en biomédecine de Strasbourg (CRBS), France)).

I.4.4. Caractérisation histologique

Pour approfondir la caractérisation de nos modèles tumoraux, nous les avons soumis à une étude histologique. Pour ce faire, nous avons mis en œuvre la méthode de coloration (Hématoxyline-éosine-safran ou HES).

- ➢ **Application de la coloration HES aux structures bio-imprimées**

La matrice de nos modèles bio-imprimés est composée de gélatine (**thermosensible**) et d'alginate. Les molécules d'alginate y sont organisées en réseau par des ponts intermoléculaires d'**ions calcium**. Sa composition et sa structure confèrent à cette matrice une certaine sensibilité à la chaleur et une sensibilité aux agents chélateurs comme le citrate de sodium et l'EDTA.

Il a fallu prendre ces propriétés en considération lors de l'application de la coloration HES à nos structures. En effet, cette coloration est généralement précédée d'étapes de fixation, de déshydratation et de découpe. Certaines de ces étapes font intervenir la chaleur et divers agents chimiques. Une phase d'optimisation a donc été nécessaire pour fixer le protocole à appliquer à nos structures bio-imprimées. Nous nous sommes notamment inspirés de certains protocoles décrits sur le site de l'entreprise CELLINK[5]. **Nous ne décrirons ici que les protocoles finaux issus de la phase d'optimisation**.

Pour appliquer la coloration HES à nos structures bio-imprimées, nous avons mis en place un protocole en 3 temps : (i) fixation des structures ; (ii) inclusion dans la paraffine et (iii) réalisation de coupes et coloration.

Fixation des structures bio-imprimées
Pour la fixation des structures bio-imprimées, les étapes suivantes ont été exécutées :

- ✓ Elimination du milieu de culture ;
- ✓ Incubation pendant 15 minutes à 37°C dans le **tampon HBSS** (de l'anglais Hank's Balanced Salt Solution). Ce tampon a été acheté auprès de Sigma-Aldrich, USA.
- ✓ Traitement par du paraformaldéhyde (PFA) à 4% supplémenté avec une solution de chlorure de calcium à 50 mM pendant une heure à température ambiante ;
- ✓ Rinçage dans du HBSS 2 fois pendant 5 minutes ;
- ✓ Déshydratation dans des bains successifs de solvants dans l'ordre suivant : éthanol à 70% ; éthanol à 96% : éthanol à 100% puis xylène à 100%.

Inclusion en paraffine, découpe et coloration
Les structures fixées ont été incluses en paraffine puis des coupes de 6 µm d'épaisseur ont été réalisées. La coloration HES proprement dite a été réalisée avec l'automate DAKO CoverStainer® et le kit de coloration associé (Santa Clara, Californie, USA).

Les structures ont été examinées à J+1, J+3 et J+7 après bio-impression. Au moins 3 structures différentes ont été examinées pour chaque point de temps. Trois expériences indépendantes ont par ailleurs été réalisées.

I.4.5. Marquages immunologiques
Plusieurs marquages immunologiques ont été réalisés pour permettre une caractérisation plus complète des structures bio-imprimées. Certains de ces marquages ont été effectués par

immunohistochimie (IHC), d'autres par immunofluorescence (IF). Nous discuterons l'intérêt d'avoir utilisé les 2 méthodes ainsi que l'intérêt de chaque marqueur évalué dans le 3ème chapitre de ce manuscrit.

- **Immunohistochimie**

Les marqueurs ayant été évalués par IHC sont les suivants : Ki-67 ; PAX8 ; SRY-related HMG-box 10 (SOX10) et vimentine. Pour réaliser les marquages, les structures ont d'abord été fixées comme décrit dans la section I.4.4. Elles ont ensuite été incluses en paraffine puis coupées en sections de 6 µm d'épaisseur. Les marquages ont été effectués par l'automate Dako Omnis IHC (Santa Clara, Californie, USA). Les caractéristiques, les concentrations et la provenance des anticorps utilisés sont récapitulés dans le Tableau 2.19.

Tableau 2.19. Caractéristiques et provenance des anticorps utilisés en immunohistochimie

Anticorps	**Clone et provenance**	**Dilution utilisée**
Anti-Ki-67	Anticorps monoclonal de souris anti-Ki-67 humain. Clone Mib1. Dako (Santa Clara, Californie, USA)	1: 50
Anti-PAX8	Anticorps polyclonal de lapin anti-PAX8 humain. Diagomics (Blaganc, France)	1: 20
Anti-SOX10	Anticorps monoclonal de lapin anti-SOX10 humain. Clone EP268 (Diagnostic Biosystems, Pleasanton, USA)	1: 200
Anti-vimentine	Anticorps monoclonal de souris anti-vimentine humaine. Clone V9. Dako (Santa Clara, Californie, USA)	1: 200

- **Immunofluorescence**

L'immunofluorescence a été utilisée pour évaluer l'expression du marquer FAP (de l'anglais Fibroblast Activation Protein) au sein de nos structures bio-imprimées. Pour ce faire, les

structures ont d'abord été fixées comme décrit dans la section I.4.4. Elles ont ensuite été incluses en paraffine puis coupées en sections de 6 µm d'épaisseur.

Le marquage a ensuite été effectué via une procédure manuelle en appliquant les étapes suivantes :

- ✓ Déparaffinage et réhydratation des échantillons par passage dans plusieurs bains de solvants dans l'ordre suivant : eau distillée ; Xylène ; éthanol à 100% ; éthanol à 96% ; éthanol à 70% ; eau distillée ;
- ✓ Démasquage antigénique via un traitement par un tampon citrate à pH = 6 à 90°C pendant 10 minutes. Les échantillons sont ensuite maintenus à température ambiante pendant 20 minutes (refroidissement) avant d'être rincés au PBS ;
- ✓ Traitement des échantillons pendant 45 minutes par une solution de blocage. Il s'agit d'une solution d'albumine bovine à 5% dans du PBS ;
- ✓ Traitement par l'anticorps primaire (anticorps polyclonal de lapin anti-FAP humain, Fisher Scientific, USA) à une dilution de 1: 100 pendant une heure à température ambiante ;
- ✓ Rinçage 2 fois au PBS et traitement par l'anticorps secondaire (anticorps anti-IgG de lapin, Sigma-Aldrich, USA) à une dilution de 1: 100 pendant une heure à température ambiante ;
- ✓ Rinçage au PBS et addition d'une goutte de milieu de montage Vectashield® (Vector labs, France) ;
- ✓ Les échantillons placés entre lame et lamelle ont ensuite été conservés à +4°C. Ils ont été observés au microscope à épifluorescence (AX-70 Provis, Olympus, Paris, France) le jour suivant.

Tous les marquages immunologiques (IHC et IF) ont été réalisées à J+7 après bio-impression sur trois types de structures :

- ✓ Des structures contenant des SKOV-3 et des MeWo (0,5 x 10^6 Cell. / mL de bio-encre pour chaque type cellulaire soit une concentration totale de 10^6 Cell. / mL) ;
- ✓ Des structures contenant des SKOV-3 uniquement (0,5 x 10^6 Cell. / mL de bio-encre) ;
- ✓ Des structures contenant des MeWo uniquement (0,5 x 10^6 Cell. / mL de bio-encre).

Au moins trois structures différentes ont été évaluées dans chaque type et pour chaque marqueur. Trois expériences indépendantes ont par ailleurs été réalisées.

Remarque

Toutes les caractérisations histologiques et immunologiques ont été effectuées en collaboration avec Laureline Lamy de l'équipe de la Professeure Lina Bezdetnaya (Institut de Cancérologie de Lorraine, Nancy, France).

I.4.6. Imagerie longitudinale

Cette expérimentation n'était pas prévue dans la conception initiale de notre étude du modèle bio-imprimé. Elle a été finalement réalisée pour répondre à des questionnements générés par les caractérisations précédentes. Nous expliquerons cela dans le 3ème chapitre de ce manuscrit.

Le principe de cette manipulation est le suivant : les deux types cellulaires (SKOV-3 et MeWo) ont été marqués différemment avant d'être utilisés pour préparer des structures bio-imprimées. Celles-ci ont ensuite été observées sur une période de 7 jours pour visualiser les mouvements cellulaires. A chaque fois, des images ont été prises à J+1 ; J+3 et J+7 des mêmes champs microscopiques. Les SKOV-3 ont été traitées par le colorant CellVue® Claret Far Red Fluorescent Cell Linker Mini Kit for General Membrane Labeling (Sigma Aldrich, USA). Les MeWo ont été traités par le marqueur PKH67 Green Fluorescent Cell Linker Mini Kit for General Cell Membrane Labeling (Sigma Aldrich, USA). Les protocoles de traitement par les deux réactifs sont très similaires. Nous pouvons les résumer à travers les étapes suivantes :

- ✓ Récupération des cellules par trypsination et comptage au Bleu trypan ;
- ✓ Lavage des cellules par du milieu complet sans SVF ;
- ✓ Préparation des solutions de réactif (4 µL de colorant + 1 mL de tampon de dilution pour chaque 10^7 cellules) ;
- ✓ Incorporation des solutions de réactifs avec les cellules à l'abri de la lumière et incubation à température ambiante pendant 10 minutes ;
- ✓ Addition d'un excès de SVF pendant 2 minutes puis lavage des cellules 2 fois avec du milieu complet ;
- ✓ Les cellules ont ensuite été reprises dans le volume de milieu adéquat et incorporées dans l'hydrogel pour la bio-impression.

Les structures bio-imprimées ont été observées avec prise d'images à J+1 ; J+3 et J+7 après bio-impression. L'observation a été faite via le système d'imagerie automatisé ImageXpress,

(Pico, MolecularDevices, Royaume uni). Trois structures différentes ont été observées. Deux expériences indépendantes ont par ailleurs été réalisées.

Cette expérience est bien désignée comme étant de l'imagerie « longitudinale » et non de l'imagerie en temps réel. En effet, l'imagerie en temps réel implique une observation continue ou sur des intervalles très courts (de quelques secondes à quelques minutes). Alors que dans notre cas, les images ont été prises à quelques jours d'intervalle à chaque fois.

Cette expérimentation a été conduite en collaboration avec A. Chateau (Centre de Recherche en Automatique de Nancy (CRAN), Nancy, France).

II. Comportement du modèle tumoral bio-imprimé vis-à-vis d'un médicament anticancéreux : le cisplatine

Après avoir caractérisé le modèle bio-imprimé, nous avons souhaité analyser son comportement vis-à-vis du cisplatine (molécule anticancéreuse). La structure précise de cette étude et ses objectifs seront exposés en détail dans le 4ème chapitre de ce manuscrit. Ici, nous allons les évoquer brièvement et décrire les protocoles appliqués.

Cette étude a été structurée autour de trois questions principales :

- ✓ Quel est l'impact de la bio-impression sur les réponses cellulaires au cisplatine ?
- ✓ Quel est l'impact de la combinaison des deux types cellulaires (coculture) sur les réponses au cisplatine ?
- ✓ Quel est l'impact du temps sur les réponses cellulaires au cisplatine.

Pour réponde à ces trois questions, nous avons mené plusieurs études de cytotoxicité. A chaque fois, des structures bio-imprimées en 3D ou des cellules en 2D ont été exposées à différentes concentrations de cisplatine. L'activité métabolique de ces structures 3D ou cellules en 2D a ensuite été mesurée par la technique WST-1 pour évaluer leur viabilité. L'application de la technique WST-1 est donc une « étape commune » à toutes les études de cytotoxicité réalisées dans le cadre de cette partie.

Donc pour faciliter au lecteur la compréhension de la méthodologie de ces études, nous allons procéder en deux temps :

- ✓ D'abord, nous allons décrire la mise en place de la technique WST-1 en 3D (structures bio-imprimés) et en 2D ;
- ✓ Ensuite, nous allons décrire chacune des études de cytotoxicité effectuées (conditions et modalités).

Enfin une dernière partie sera consacrée aux informations relatives aux traitement et à l'expression des résultats.

II.1. Mise en place de la technique WST-1

II.1.1. En 3D (pour les structures bio-imprimées)

Nous avons appliqué le protocole décrit précédemment dans ce chapitre et que nous avons appelé « Le protocole avec élimination de la matrice **après** exposition au réactif ». Nous invitons le lecteur à se référer à ce titre pour retrouver les détails pratiques de ce protocole.

II.1.2. En 2D (en monocouche)

Pour appliquer la technique WST-1 en 2D, les cellules ont été ensemencées dans des plaques 96 puits à raison de 10^4 cellules / puits. Elles ont été exposées à une solution contenant 10% (v/v) de réactif WST-1 pendant 2 heures. L'absorbance associée au formazan a ensuite été mesurée à 450 nm.

II.2. Description des études réalisées

II.2.1. Etude de l'impact de la bio-impression 3D sur les réponses cellulaires au cisplatine

Pour mettre en évidence l'impact de la bio-impression, nous avons comparé les réponses des SKOV-3 et des MeWo au sein des tumeurs bio-imprimées à celles observées en 2D. Pour ce faire, nous avons préparé deux sortes de structures bio-imprimées :

- ✓ Des structures contenant des SKOV-3 uniquement à une concentration de 10^6 Cell. / mL de bio-encre ;
- ✓ Des structures contenant des MeWo uniquement à une concentration de 10^6 Cell. / mL de bio-encre.

La bio-impression a été réalisée selon le protocole décrit précédemment dans ce chapitre (cf. Les étapes de fabrication des structures bio-imprimées)

A J+1 après bio-impression, les structures ont été exposées à six différentes concentrations de cisplatine (100 µM ; 50 µM ; 25 µM : 12,5 µM ; 6,25 µM ; 3,125 µM) pendant 24 heures (de J+1 à J+2). Le cisplatine (Cisplatine Mylan®, Solution à 2 mg/mL) nous a été fourni par l'institut de Cancérologie de Lorraine (Nancy, France).

Après exposition pendant 24 heures (de J+1 à J+2), les solutions de médicament ont été retirées. Les structures bio-imprimées ont ensuite été supplémentées en milieu frais complet et gardées en culture pendant 24 heures supplémentaires (de J+2 à J+3). L'intérêt de cette phase de « rémission » de 24 heures est de **permettre une meilleure manifestation de l'effet cytotoxique du cisplatine**[6]. A J+3, l'activité métabolique au sein des structures bio-imprimées a été mesurée par la technique WST-1. Les résultats obtenus ont été exprimés en pourcentage de viabilité par rapport à des structures non exposées au cisplatine (contrôle positif). Quatre réplicas techniques (4 structures bio-imprimées différentes) ont été évalués pour chacune des conditions considérées (les 6 concentrations et le contrôle positif).

Des cellules en culture 2D ont également été traitées au cisplatine suivant la même logique. Des cellules (SKOV-3 ou MeWo) ont été cultivées dans des plaques 96 puits (10^4 cellules / puits) et incubées pendant 24 heures afin d'adhérer au support de culture. Ensuite, elles ont été exposées à six différentes concentrations de cisplatine pendant 24 heures puis supplémentées en milieu frais et gardées en culture pendant 24 heures (rémission). L'activité métabolique de ces cellules a ensuite été mesurée par la technique WST-1.

Les résultats 2D ont été exprimés en pourcentage par rapport au contrôle positif (cellules non exposées au cisplatine). Huit réplicas techniques (8 puits indépendants) ont été évalués pour chacune des conditions considérées (les 6 concentrations et le contrôle positif).

Trois expériences indépendantes ont été réalisées pour chacun des deux types cellulaires (SKOV-3 ou MeWo) en 2D et en 3D.

II.2.2. Etude de l'impact de la combinaison des deux types cellulaires

Le but de cette expérience était d'étudier la réponse au cisplatine de la coculture par rapport aux monocultures en 3D (au sein des structures bio-imprimés) et aussi en 2D.

Pour la 3D, nous avons préparé des structures bio-imprimées contenant des SKOV-3 **et des** MeWo (0,5 x 10^6 Cell. / mL de bio-encre pour chacun des deux types cellulaires soit une concentration totale de 10^6 Cell. / mL de bio-encre). Ces structures ont été exposées à six concentrations différentes de cisplatine pendant 24 heures (de J+1 à J+2) suivies de 24 heures de rémission (de J+2 à J+3). Leur activité métabolique a ensuite été mesurée par la technique WST-1. Les résultats obtenus ont été exprimés en pourcentage de viabilité par rapport à des structures non exposées au cisplatine (contrôle positif). Quatre réplicas techniques (4

structures bio-imprimées différentes) ont été évalués pour chacune des conditions considérées (les 6 concentrations et le contrôle positif). Les résultats de **la coculture 3D** ont été comparés à ceux obtenus précédemment en **monocultures en 3D**.

Pour la 2D, nous avons préparé une suspension contenant 50% de SKOV-3 et 50% de MeWo. Celle-ci a été utilisée pour ensemencer des plaques 96 puits (10^4 cellules par puits dont 50% de SKOV-3 et 50% de MeWo). Les cellules ont été incubées pendant 24 heures afin d'adhérer au support de culture. Ensuite, elles ont été exposées à six différentes concentrations de cisplatine pendant 24 heures puis supplémentées en milieu frais et gardées en culture pendant 24 heures (rémission). L'activité métabolique de ces cellules a ensuite été mesurée par la technique WST-1. Les résultats ont été exprimés en pourcentage par rapport au contrôle positif (cellules non exposées au cisplatine). Huit réplicas techniques (8 puits indépendants) ont été évalués pour chacune des conditions considérées (les 6 concentrations et le contrôle positif). Les résultats de **la coculture 2D** ont été comparés à ceux obtenus précédemment en **monocultures en 2D**.

A noter que trois expériences indépendantes ont été réalisées en 3D (structures bio-imprimées) et en 2D.

II.2.3. Etude de l'impact du temps sur les réponses cellulaires au cisplatine

Le but ici était de déterminer si le temps de mise en culture avait (ou pas) un impact sur les réponses cellulaires au cisplatine. Nous avons donc préparé des cocultures et nous les avons gardées à l'incubateur pendant 5 jours avant de les exposer au cisplatine **(traitement à J+5)**. Les résultats obtenus ont ensuite été comparés à ceux issus de cocultures exposées au cisplatine **à J+1 après leur préparation**. Cette étude a été menée sur des cocultures en 3D (au sein des structures bio-imprimées) et en 2D.

Pour la 3D, nous avons préparé des structures bio-imprimées contenant des SKOV-3 et des MeWo (0,5 x 10^6 Cell. / mL de bio-encre pour chacun des deux types cellulaires soit une concentration totale de 10^6 Cell. / mL de bio-encre). **Les structures ont d'abord été gardées en culture pendant 5 jours (de J0 à J+5)**. Ensuite, elles ont été exposées à six concentrations différentes en cisplatine pendant 24 heures (de J+5 à J+6) puis mises en rémission pendant 24 heures (de J+6 à J+7). A J+7, l'activité métabolique de ces structures a été mesurée par la technique WST-1. Les résultats obtenus ont été exprimés en pourcentage de viabilité par rapport à des structures non exposées au cisplatine (contrôle positif). Quatre réplicas

techniques (4 structures bio-imprimées différentes) ont été évalués pour chacune des conditions considérées (les 6 concentrations et le contrôle positif). Les résultats obtenus via cette expérience ont été comparés à ceux issus des cocultures 3D traitées au cisplatine à J+1.

Pour la 2D, nous avons préparé une flasque T75 contenant 50% de SKOV-3 et 50% de MeWo. Nous avons gardé cette flasque en culture pendant 4 jours (de J0 à J+4 après sa préparation). A J+4, les cellules ont été récupérées par trypsination et ensemencées dans des plaques 96 puits à raison de 10^4 cellules / puits. Les cellules ont été incubées de nouveau pendant 24 heures (de J+4 à J+5) pour permettre leur adhésion au support de culture. A J+5, elles ont été traitées avec six concentrations différentes de cisplatine pendant 24 heures (de J+5 à J+6) puis mises en rémission pendant 24 heures (de J+6 à J+7). A J+7, l'activité métabolique de ces cellules a été mesurée par la technique WST-1. Les résultats obtenus ont été exprimés en pourcentage de viabilité par rapport à des cellules non exposées au cisplatine (contrôle positif). Huit réplicas techniques (8 puits différents) ont été évalués pour chacune des conditions considérées (les 6 concentrations et le contrôle positif). Les résultats obtenus via cette expérience ont été comparés à ceux issus des cocultures en 2D traitées au cisplatine à J+1. Trois expériences indépendantes ont par ailleurs été réalisées en 3D et en 2D.

II.3. Traitement des résultats

Nous avons effectué plusieurs études de cytotoxicité. Chaque étude comportait plusieurs conditions différentes (plusieurs concentrations différentes en cisplatine en plus du contrôle positif). Pour chaque concentration, nous avons calculé un pourcentage de viabilité (exprimé comme la moyenne ± l'écart-type sur les trois expériences indépendantes réalisées). Après avoir déterminé les pourcentages moyens de viabilité pour chaque concentration, nous avons dressé la courbe (dose – effet) et nous avons calculé la concentration inhibitrice 50 (IC_{50}) correspondant à chaque étude. Pour cela, nous avons utilisé le logiciel GraphPad prism 8.0.1. Nous considérons l'IC_{50} ici comme la concentration en cisplatine (en µM) entrainant la mort de 50% de la population cellulaire.

III. Intégration du modèle tumoral bio-imprimé au sein d'un système microfluidique

L'objectif de cette partie était de concevoir un système microfluidique permettant la mise en culture des tumeurs bio-imprimées sous flux physiologique. Le contexte bibliographique et les axes de travail seront évoqués en détail dans l'introduction du 5ème chapitre de ce manuscrit. Ici nous allons nous contenter de décrire brièvement les objectifs à atteindre à travers ce système microfluidique. Nous détaillerons ensuite la méthodologie appliquée.

Nous voulions donc concevoir un système microfluidique nous permettant de mettre en culture les modèles tumoraux bio-imprimés sous flux physiologique. Ce système devait aussi répondre aux deux exigences suivantes :

- ✓ Simuler le trajet vasculaire du médicament en plus de son interaction avec le tissu cible ;
- ✓ Permettre de tester, en même temps, plusieurs concentrations différentes de médicaments.

Pour atteindre ces objectifs, nous avons structuré cette partie en trois grandes phases :

- ✓ Conception d'un premier prototype que nous avons appelé « **système mono-serpentin** ». Le but de ce système est de pouvoir simuler le trajet vasculaire du médicament en plus de l'interaction avec le tissu tumoral ;
- ✓ Inclusion des tissus tumoraux bio-imprimés au sein du système mono-serpentin et évaluation de leur viabilité après perfusion ;
- ✓ Conception d'un système **multi-serpentin**. Celui-ci constitue une version « améliorée » du système mono-serpentin. La plus-value de ce système multi-serpentin est de permettre de tester, en même temps, plusieurs concentrations différentes de médicament sur un même support.

Nous allons structurer cette partie autour de ces trois phases. Nous allons décrire le matériel utilisé ainsi que la méthodologie appliquée dans le cadre de chaque phase.

III.1. Conception du système microfluidique mono-serpentin

III.1.1. Design du système mono-serpentin

Ici, nous allons décrire le design du système mono-serpentin pour permettre au lecteur de l'imaginer et de comprendre la suite de la partie méthodologique.

L'intérêt de chaque élément du design et les explications associées seront abordés en détail dans le 5ème chapitre de ce manuscrit.

Le design imaginé pour le système mono-serpentin est illustré par la Figure 2.24.

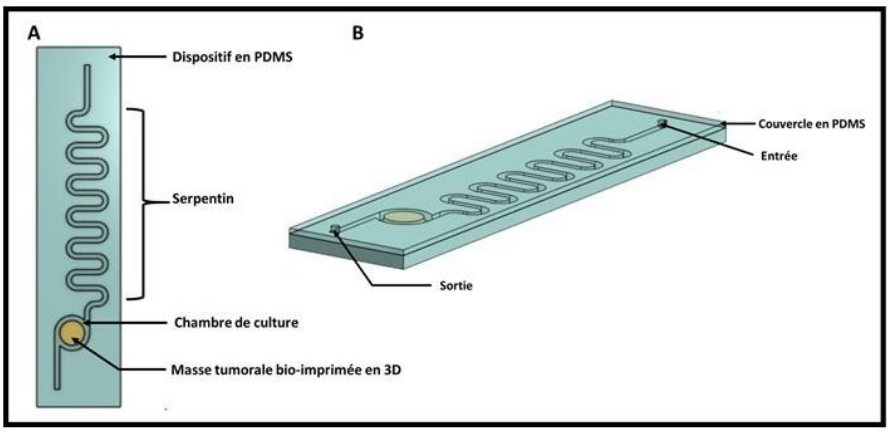


Figure 2.24. Design du système microfluidique mono-serpentin. A. Vue d'en haut (sans le couvercle en PDMS). B. Vue de profil (avec le couvercle en PDMS).

Comme on peut le voir sur la Figure 2.24A, le système mono-serpentin comprend un canal microfluidique sous forme de serpentin (d'où son nom). Ce canal aboutit à une chambre de culture destinée à accueillir la masse tumorale bio-imprimée (nous expliquerons un peu plus loin comment la masse bio-imprimée est introduite dans la chambre).

Comme on peut le voir sur la Figure 2.24B, le système mono-serpentin est constitué de deux couches de PDMS :

- ✓ Une couche inférieure qui comprend le motif (canal en serpentin + chambre de culture) ;
- ✓ Une couche supérieure qui permet de sceller le système. Autrement dit, cette couche supérieure fait office de couvercle. Elle comprend une entrée et une sortie permettant la mise sous perfusion du dispositif microfluidique.

Les dimensions du système seront évoquées et discutées dans le 5ème chapitre de ce manuscrit.

III.1.2. Fabrication du système mono-serpentin

Pour fabriquer le système mono-serpentin, nous avons utilisé une approche par moulage. Cette approche comprend trois grandes étapes :

- ✓ Fabrication d'un moule ou « template » par impression 3D ;
- ✓ Fabrication de la couche inférieure du système en PDMS (la couche comprenant le canal en serpentin et la chambre de culture) ;
- ✓ Scellement du système avec une couche supérieure de PDMS et création de l'entrée et de la sortie.

Nous allons détailler chacune de ces trois étapes :

- ➢ **Fabrication du moule par impression 3D**

Nous avons commencé par dessiner le moule sur le l'outil de CAO 3D en ligne Onshape. Nous l'avons ensuite exporté sous forme de fichier .stl. Ce fichier a été confié à un centre de compétences spécialisé au sein de l'Institut Jean Lamour. Celui-ci s'est chargé de fabriquer les pièces correspondantes par impression 3D. Le matériau utilisé pour l'impression était l'acrylonitrile butadiène styrène (ABS). La résolution de l'imprimante 3D utilisée était de 12.5 µm en X et Y et de 2.5 µm en Z.

Le dessin 3D du moule et les pièces obtenues après impression **sont illustrés par** la Figure 2.25.

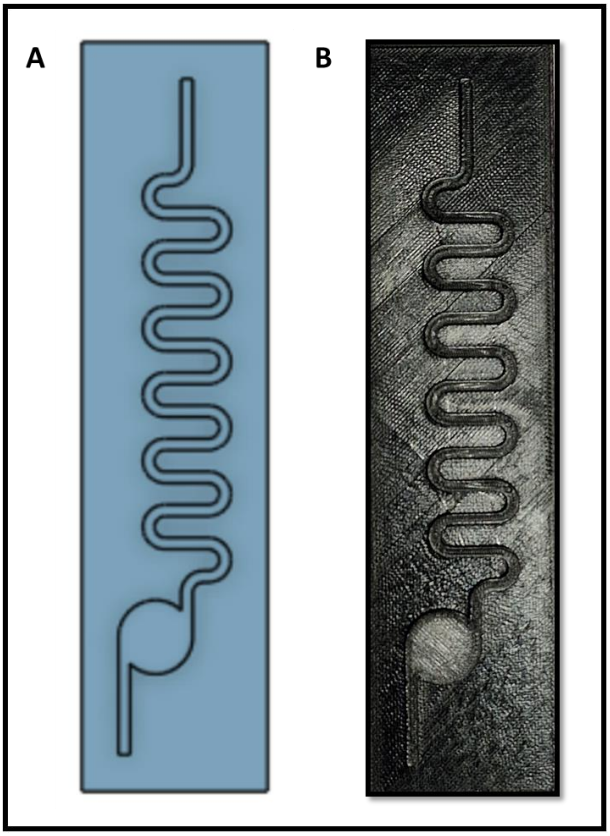


Figure 2.25. Moule utilisé pour fabriquer le système mono-serpentin : A. Dessin 3D. B. Pièce obtenue par impression 3D.

Comme on peut le voir sur la Figure 2.25, le moule comprend un socle sur lequel est imprimé le motif (serpentin + chambre de culture). Ce socle a un rôle dans le process de fabrication que nous allons découvrir dans le point suivant.

- **Fabrication de la couche inférieure du système en PDMS**

Pour fabriquer la couche inférieure du système mono-serpentin, nous avons utilisé les moules préparés précédemment par impression 3D. Nous avons procédé selon les étapes suivantes :

- ✓ Collage des moules au fond d'une boite de forme et de taille adéquate : Pour ce faire, quelques points de colle ont été appliqués sur le socle des moules avant de les poser au fond de la boite et de les soumettre à une pression mécanique. Les moules ont ensuite été laissés 24 heures à température ambiante pour s'assurer du séchage de la colle ;
- ✓ Préparation du mélange (PDMS liquide – agent réticulant) : Le PDMS liquide et l'agent réticulant (Sylgard 184, Neyco, France) ont été mélangés à un ratio (10 : 1) en masse.

Le mélange a ensuite été introduit sous une cloche à vide pour éliminer les bulles d'air ;

- ✓ Versement du mélange (PDMS liquide – agent réticulant) sur les moules : Après ce versement, les boites ont de nouveau été placées sous cloche à vide pour s'assurer de l'élimination des bulles d'air ;
- ✓ Réticulation par traitement thermique : les boites contenant le mélange (PDMS – agent réticulant) coulé sur les moules ont été exposées à une température de 40°C pendant 24 heures. Ce traitement permet la réticulation du PDMS. Le motif du moule s'imprime ainsi dans le mélange qui devient solide ;
- ✓ Démoulage : Après réticulation, les couches inférieurs des systèmes en PDMS ont été retirées des boites et séparées des moules.

- ➢ **Scellement du système avec une couche supérieure de PDMS**

Nous avons d'abord dû fabriquer cette couche supérieure ou « couvercle » en PDMS. Pour ce faire, un mélange (PDMS – agent réticulant ; ratio 10 : 1 en masse) a été préparé, débarrassé des bulles d'air sous cloche à vide puis coulé sur une boite à fond plat. Après réticulation par traitement thermique (40°C, 24 heures), les couches de PDMS obtenues ont été récupérées et coupées à la taille appropriée (même taille que celle de la couche inférieure préparée précédemment).

Nous avons ensuite procédé au scellement des dispositifs (collage de la couche supérieure à la couche inférieure). Pour ce faire, nous avons eu recours à l'activation des surfaces de PDMS par traitement au plasma à oxygène. Un four à plasma O_2 a été utilisé à cet effet (Tucano ; Gambetti kenologia ; Italie). Les éléments en PDMS (couche supérieure + couche inférieure) y ont été introduits puis traités au plasma à une puissance de 50 W pendant 30 secondes.

Après activation des surfaces, les deux parties du système ont été retirées du four à plasma. La couche supérieure a ensuite été rapidement appliquée sur la couche inférieure. Une pression mécanique a finalement été exercée pour permettre le collage des deux parties.

Lorsque les deux surfaces ont été collées, des aiguilles ont été utilisées pour créer des orifices correspondant à l'entrée et à la sortie du dispositif. Celui-ci pouvait ainsi être connecté au système de perfusion (pousse-seringue ou pompe péristaltique).

Après avoir fabriqué les premiers prototypes du système mono-serpentin, la prochaine étape était d'y introduire le modèle tumoral bio-imprimé et d'évaluer sa viabilité. C'est ce que nous allons décrire dans le prochain titre.

III.2. Intégration du modèle bio-imprimé au sein du système mono-serpentin

L'objectif ici était d'introduire la tumeur bio-imprimée au sein du système mono-serpentin et d'évaluer sa viabilité après 48 heures de perfusion continue sous flux physiologique. Pour ce faire, nous avons exécuté les étapes suivantes :

A J0 : Nous avons préparé des structures bio-imprimées contenant 50% de SKOV-3 et 50% de MeWo. Le protocole appliqué pour la bio-impression est celui décrit dans la première partie de ce chapitre (cf. Les étapes de fabrication des structures bio-imprimées). Les structures bio-imprimées ont été maintenues en culture dans l'incubateur (37°C ; 5% de CO_2) de J0 à J+1.

Toujours à J0, nous avons entamé la préparation des systèmes microfluidiques (préparation du mélange (PDMS – réticulant) et coulage sur les moules). Les systèmes ont ensuite été introduits dans l'étuve à 40°C pour permettre la réticulation du PDMS entre J0 et J+1.

A J+1 : Les structures bio-imprimées ont été intégrées au sein du systèmes microfluidique. Une structure a été introduite dans chaque système de la façon suivante :

- ✓ Les deux couches du système ont d'abord été traitées au plasma à oxygène pour activer leurs surfaces ;
- ✓ Après retrait du four à plasma, une structure bio-imprimée à été placée au centre de la chambre de culture dans la couche inférieure du système ;
- ✓ Immédiatement après ; la couche supérieure (le couvercle en PDMS) a été appliquée sur la couche inférieure pour sceller le système. Les manipulations ont été organisées de telle sorte à réduire au minimum la durée entre l'activation au plasma des deux surfaces en PDMS et leur application l'une sur l'autre ;

Après intégration de la tumeur et scellement du système, l'entrée et la sortie ont été créées avec une aiguille. La connexion au dispositif de perfusion était alors possible. Nous avons utilisé une pompe péristaltique (G100-2J ; pompe péristaltique pour incubateur ; Darwin microfluidics ; France) pour perfuser du milieu (DMEM – MEM) dans les systèmes contenant les tumeurs. Un débit de 67,5 µL/min a été appliqué. Ce débit permet d'avoir, à la sortie du canal en serpentin, une vitesse d'écoulement de 0,5 mm/s. Cette vitesse s'inscrit dans le

même ordre de grandeur que les vitesses d'écoulement du sang dans les capillaires *in vivo* (0,5 – 1,5 mm/s en fonction des tissus et des références)[7–9]. La perfusion a par ailleurs été maintenue durant 48 heures (de J+1 à J+3) à l'intérieur de l'incubateur (37°C et 5% de CO_2).

A J+3 (à la fin des 48 heures de perfusion). Nous avons procédé à une réouverture des systèmes microfluidiques pour récupérer les tumeurs bio-imprimées. Une lame de bistouri a été utiliser pour séparer les deux couches de PDMS de chaque système et accéder à la chambre de culture. Les tumeurs bio-imprimées (une tumeur par système) ont ensuite été récupérées et remises dans une plaque 24 puits pour évaluer leur viabilité via le test WST-1.

Le test WST-1 a été conduit en appliquant le protocole basé sur la dissolution de la matrice après exposition au réactif. Ce protocole a été décrit dans la première partie de ce chapitre (cf. Le protocole avec élimination de la matrice **après** exposition au réactif).

Les résultats obtenus ont été exprimés en pourcentage de viabilité par rapport à des structures bio-imprimées maintenues en cultures en conditions statiques (contrôle positif). Ces conditions statiques correspondent à une culture à l'intérieur de plaques 24 puits dans l'incubateur à 37°C et 5% de CO_2 de J0 à J+3. Le choix de ce contrôle positif se justifie par l'objectif de la manipulation. Nous voulions en effet déterminer l'impact de la mise sous perfusion sur la viabilité des structures bio-imprimées d'où la pertinence de comparer ces structures perfusées à des structures similaires mais non perfusées.

A noter également que cette expérience a été conduite en triplica et que trois expériences indépendantes ont été réalisées.

Après avoir utilisé le système mono-serpentin pour mettre en culture les structures bio-imprimées sous flux physiologique, nous avons entrepris l'élaboration d'une version plus « avancée » de ce système. Cette version a été appelée « système microfluidique à cinq serpentins ». C'est ce dont nous allons parler dans le prochain titre.

III.3. Conception du système microfluidique à 5 serpentins

Par rapport au système mono-serpentin, la plus-value du système 5 serpentins est de permettre de tester, en même temps, plusieurs concentrations différentes de médicament sur le même support microfluidique.

L'élaboration du système à 5 serpentins est passé par plusieurs phases. A chaque fois, c'est le résultat d'une phase qui a dicté la conduite à tenir pour la phase suivante. C'est un donc un « long cheminement » que nous allons décrire en détail dans le 5ème chapitre de ce manuscrit.

Ici, nous allons nous contenter d'aborder la méthodologie générale visant à développer ce système. Pour permettre au lecteur de comprendre cette méthodologie, nous allons commencer pour fournir un schéma du design du système à 5 serpentins. Celui-ci est illustré par la Figure 2.26.

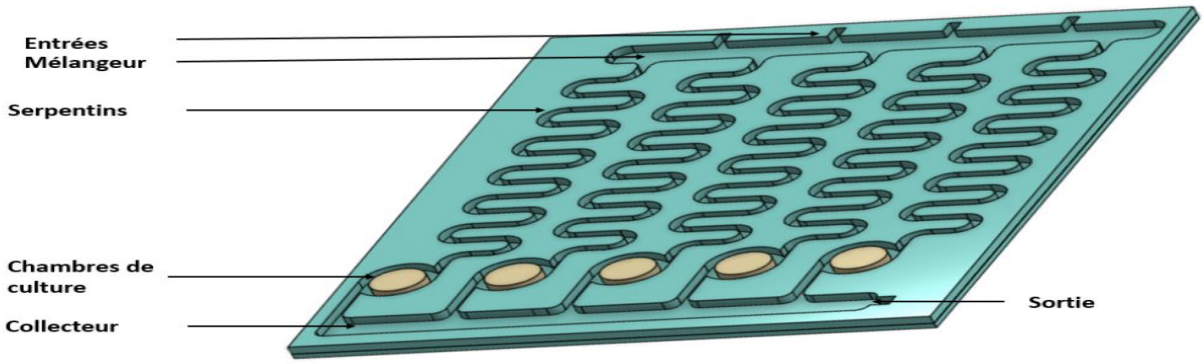


Figure 2.26. Design du système microfluidique à cinq serpentins.

Comme on peut le voir sur la Figure 2.26, Le système à 5 serpentins comprend un mélangeur disposant de 4 entrées et 5 sorties. Ces sorties se prolongent par des canaux en serpentins. Ceux-ci aboutissent à des chambres de culture destinées à accueillir les structures bio-imprimées. Pour concevoir ce design, c'est d'abord le mélangeur qui a constitué un enjeu très important. **Il devait pouvoir générer plusieurs concentrations de médicaments à partir d'une même solution initiale**. Autrement dit, avec une même solution injectée au niveau des différentes entrées, on devait pouvoir obtenir, aux différentes sorties du mélanger (et donc dans les serpentins et les chambres de culture), plusieurs concentrations différentes de principe actif. Pour atteindre cet objectif, il a donc fallu optimiser le design du mélangeur, et notamment la position et l'espacement des entrées et des sorties.

Pour mener à bien cette partie du projet, nous avons eu recours à la mécanique des fluides numérique (Computational Fluid Dynamics ou CFD en anglais). Ceci a été fait en étroite collaboration avec Docteure Cécile Lemaitre (Laboratoire Réactions et Génie des Procédés (LRGP) ; Nancy ; France). Commençons par souligner que la CFD est un domaine de recherche extrêmement vaste et complexe. Dans le cadre de ce projet, nous avons utilisé cette science

comme « outil » pour répondre à une partie de la problématique de la thèse mais ce ne fut pas notre principal axe de travail. Aussi, nous ne donnerons ici que des explications simplifiées nécessaires au lecteur pour comprendre le travail que nous avons effectué.

Nous allons commencer par définir brièvement la CFD avant de décrire son application dans le cadre de notre projet.

III.3.1. Définition de la mécanique des fluides numérique (CFD)

La CFD est une science qui utilise des outils informatiques pour prédire quantitativement les phénomènes d'écoulement des fluides en se basant sur les lois de conservation (conservation de la masse, de la quantité de mouvement et de l'énergie) qui régissent le mouvement de ces fluides. Ces prédictions sont généralement établies dans des conditions définies en termes de géométrie, des propriétés physiques du fluide, ainsi que des conditions initiales et aux limites du champ d'écoulement. Plusieurs grandeurs relatives aux phénomènes d'écoulement peuvent être prédites par la CFD telles que la vitesse, la pression ou la température, à des emplacements et à des points de temps donnés[10].

III.3.2. Le logiciel Ansys Fluent

Ansys Fluent fait partie des logiciels utilisés en CFD. Il est très présent aussi bien en industrie qu'en recherche académique. Le rôle de cet outil est de permettre de paramétrer les simulations en mécanique des fluides et de réaliser les calculs nécessaires à l'obtention des résultats correspondants. Il fonctionne en complémentarité avec deux autres logiciels :

- ✓ Le logiciel Ansys DesignModeler : C'est l'outil qui permet de créer la géométrie 3D qui sera assujettie aux simulations ;
- ✓ Le logiciel Ansys Meshing : C'est l'outil qui permet de réaliser le « maillage » de la géométrie. Le maillage consiste à diviser la géométrie 3D en un grand nombre de volumes de plus petite taille appelées des mailles. Cette opération est importante car elle conditionne la qualité et la précision des résultats obtenus par la suite pour la simulation.

III.3.3. Application de la CFD dans le cadre de la conception du système à 5 serpentins

- ➢ **Les objectifs de départ**

Lorsque nous avions débuté « l'aventure CFD », nous avions fixé quelques objectifs par rapport aux performances du système qu'on souhaitait obtenir :

1. Avoir une concentration différente de médicament à la sortie de chaque serpentin ;

2. Avoir une sortie avec une concentration nulle en médicament : Le but étant d'avoir **un témoin non exposé au médicament dans l'une des chambres de culture** ;

3. Avoir une distribution « pertinente » des concentrations sur les serpentins. Autrement dit, il fallait que les concentrations aux différentes sorties soient suffisamment espacées pour permettre un test de cytotoxicité. Habituellement au sein de notre équipe, ces tests de cytotoxicité sont réalisés avec des gammes de concentrations décroissantes par 50% à chaque fois (Ex. 100 µM ; 50 µM ; 25 µM ; 12,5 µM etc.). Nous voulions que notre système génère des gammes équivalentes.

Cependant par rapport à ce 3ème objectif, notre cahier des charges initial était resté relativement vague. En effet, lorsque nous avions débuté ce travail, nous ne savions pas ce qu'on allait obtenir. Ainsi, nos attentes se sont précisées au fur et à mesure de l'évolution du travail.

- **La stratégie de travail**

Notre stratégie de travail a été structurée en plusieurs phases. Au début, une première géométrie avec un mélangeur à 6 entrées et 5 sorties a été conçue. Elle a été assujettie à plusieurs simulations. A l'issue de chaque simulation, le design a été amélioré pour satisfaire au mieux nos trois objectifs jusqu'à aboutir au design final avec 4 entrées et 5 sorties. Nous raconterons cela plus en détail dans le 5ème chapitre de ce manuscrit.

Le logiciel Ansys DesignModeler a été utilisé pour créer les géométries et le logiciel Ansys Meshing a permis de faire les maillages. Les simulations ont ensuite été réalisées par Ansys Fluent.

III.3.4. Validation expérimentale des premiers prototypes du système à 5 serpentins

Lorsque les simulations ont abouti à des designs de systèmes correspondant suffisamment à nos attentes, nous sommes passés à la validation expérimentale de ces systèmes.

La première étape de cette validation expérimentale consistait à vérifier les concentrations en principe actif à la sortie de chaque serpentin. **Autrement dit, il s'agissait de s'assurer que les concentrations expérimentales mesurées à la sortie de chaque serpentin correspondaient bien aux concentrations théoriques prédites par les simulations numériques**.

Le concept de cette manipulation était simple. On devait perfuser, dans le système 5 serpentins, une solution médicamenteuse dont la concentration est connue. Ensuite, on devait recueillir les solutions obtenues aux sorties des serpentins ; déterminer leurs concentrations respectives et les comparer à celles prédites théoriquement. Bien entendu, les modalités de perfusion, et notamment le débit appliqué, devaient correspondre à celles imposées lors des simulations.

D'un point de vue technique, la mise en place de cette manipulation a été faite en trois grandes étapes :

- ✓ Fabrication du système à 5 serpentins ;
- ✓ Validation « visuelle » des différentes concentrations :
- ✓ Validation quantitative des différentes concentrations.

- ➢ **Fabrication du système à 5 serpentins**

Pour cette phase de validation des concentrations, **nous avons fabriqué une version « adaptée » du système à cinq serpentins**. Celle-ci est similaire à celle illustrée par la Figure 2.26 **sauf qu'elle ne comprend pas les chambres de culture ni le collecteur**. Pour la fabrication, nous avons appliqué une approche par moulage identique à celle décrite pour le système mono-serpentin

Le dessin 3D du moule utilisé pour fabriquer cette version « adaptée » du système à 5 serpentins est illustré par la Figure 2.27.

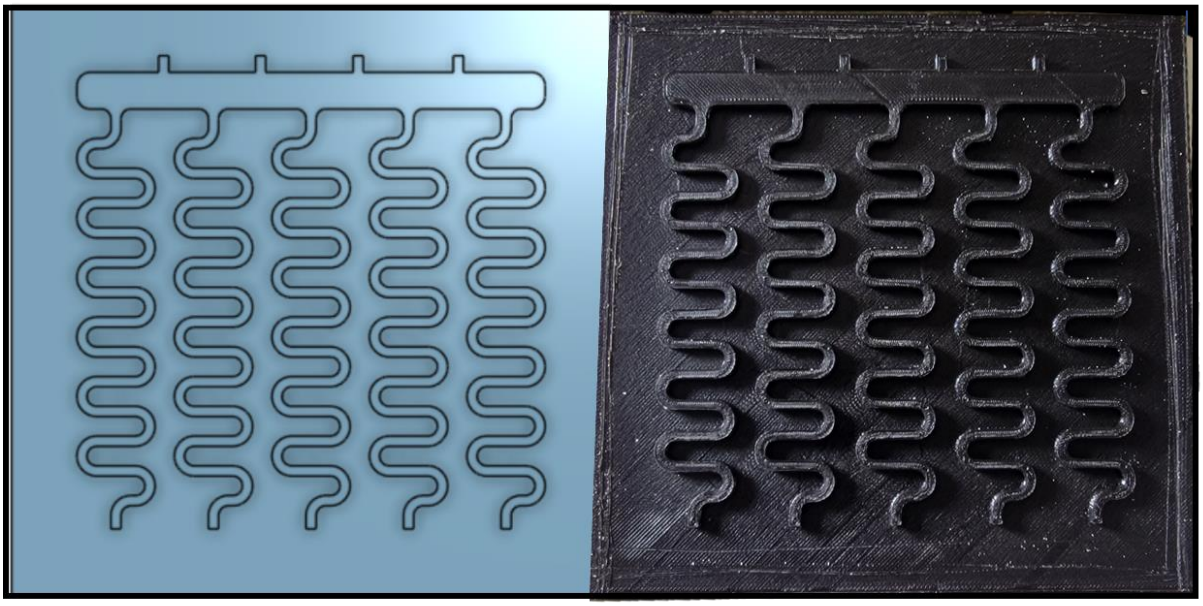


Figure 2.27. Le moule utilisé pour fabriquer la version adaptée du système 5 serpentins (à gauche) et une photo du moule obtenu par impression 3D (à droite)

Ainsi cette version adaptée facilite grandement les manipulations dans le cadre de la validation expérimentales des différentes concentrations. En effet, en l'absence des chambres de culture, les serpentins sont plus facilement accessibles. Les solutions à leurs sorties peuvent donc être recueillies très facilement.

- **Validation visuelle des différentes concentrations**

Après avoir fabriqué un premier prototype de la version adaptée du système à cinq serpentins, nous l'avons utilisée pour faire une validation « visuelle » des différentes concentrations. Commençons par préciser que cette manipulation n'a pas de valeur scientifique. Son objectif était surtout de « voir » la manière dont un soluté se répartit dans le système.

Pour réaliser cette expérience, nous avons préparé une solution aqueuse de bleu patenté V (colorant alimentaire E 131) en incorporant le colorant en poudre dans de l'eau distillée. La solution obtenue à ensuite été perfusée dans la version adaptée du système à 5 serpentins. Le débit de perfusion appliqué à chacune des 4 entrées fut de 84,37 µL/min. Nous avons ensuite suivi le déroulement de la perfusion et observé les différentes dégradations de la coloration bleue dans les serpentins.

- **Validation quantitative des différentes concentrations**

Pour la validation quantitative des concentrations, nous avons utilisé un principe actif médicamenteux : la doxorubicine. Il s'agit d'un médicament anticancéreux. Il nous été fourni par l'institut de cancérologie de Lorraine (Nancy ; France).

A partir de la solution mère à 2 mg/mL, nous avons commencé par préparer une solution de doxorubicine à 100 µg/mL dans du PBS. Nous avons également préparé une gamme de solutions étalons et mesuré leur absorbance par spectroscopie à 487 nm. Nous avons ensuite dressé une courbe d'étalonnage (absorbance en fonction de la concentration en doxorubicine).

Par la suite, nous avons perfusé la solution de doxorubicine à 100 mg/mL dans le système à 5 serpentins (c'est bien entendu la version adaptée qui a été utilisée). Le débit de perfusion appliqué fut de 84,37 µL/min. Les solutions aux sorties des serpentins ont été recueillies et leurs absorbances respectives ont également été mesurées à 487 nm. L'équation de la courbe étalon dressée préalablement a été utilisée pour calculer la concentration en doxorubicine de chaque solution à partir de son absorbance.

Ainsi, nous en avons terminé avec le 2ème chapitre. Nous allons à présent passer au 3ème chapitre relatif à la création et à la caractérisation du modèle tumoral ovarien bio-imprimé en 3D.

Références bibliographiques

1. Fakhruddin K, Hamzah M, Razak SIA. Effects of extrusion pressure and printing speed of 3D bioprinted construct on the fibroblast cells viability. *IOP Conf Ser: Mater Sci Eng*. 2018;440:012042. doi:10.1088/1757-899X/440/1/012042

2. Merakchi A, Bettayeb S, Drouiche N, Adour L, Lounici H. Cross-linking and modification of sodium alginate biopolymer for dye removal in aqueous solution. *Polym Bull*. 2019;76(7):3535-3554. doi:10.1007/s00289-018-2557-x

3. André A, Thierry P, Aurélie KAS. *Biophysique (4° Éd.)*. Lavoisier; 2013.

4. Wu Z, Su X, Xu Y, Kong B, Sun W, Mi S. Bioprinting three-dimensional cell-laden tissue constructs with controllable degradation. *Sci Rep*. 2016;6(1):24474. doi:10.1038/srep24474

5. jesperlindahl. Fixation Protocol. CELLINK. Accessed February 27, 2023. https://www.cellink.com/protocols/fixation-protocol/

6. Brodeur MN, Simeone K, Leclerc-Deslauniers K, et al. Carboplatin response in preclinical models for ovarian cancer: comparison of 2D monolayers, spheroids, ex vivo tumors and in vivo models. *Sci Rep*. 2021;11:18183. doi:10.1038/s41598-021-97434-w

7. Ivanov KP, Kalinina MK, Levkovich YuI. Blood flow velocity in capillaries of brain and muscles and its physiological significance. *Microvascular Research*. 1981;22(2):143-155. doi:10.1016/0026-2862(81)90084-4

8. Hudetz AG. Blood Flow in the Cerebral Capillary Network: A Review Emphasizing Observations with Intravital Microscopy. *Microcirculation*. 1997;4(2):233-252. doi:10.3109/10739689709146787

9. Ye F, Yin S, Li M, Li Y, Zhong J. In-vivo full-field measurement of microcirculatory blood flow velocity based on intelligent object identification. *J Biomed Opt*. 2020;25(1):016003. doi:10.1117/1.JBO.25.1.016003

10. Hu HH. Computational Fluid Dynamics. In: *Fluid Mechanics*. 5th ed. Elsevier; 2012:421-472. doi:10.1016/B978-0-12-382100-3.10010-1

Chapitre 3 : Etablissement d'un modèle tridimensionnel d'une tumeur ovarienne par bio-impression 3D

Introduction

Les tumeurs cancéreuses sont des structures hautement complexes. Plusieurs populations cellulaires y interagissent étroitement dans un environnement tridimensionnel. La culture cellulaire en monocouche (en 2D) semble incapable de reproduire une telle complexité *in vitro*. Aussi, les techniques de culture cellulaire en 3D sont de plus en plus employées pour créer des modèles tumoraux plus réalistes et plus prédictifs.

Parmi ces techniques, la bio-impression 3D revêt un intérêt particulier. Etant une approche assistée par ordinateur, elle offre une grande flexibilité de design tout en garantissant une bonne reproductibilité. Elle permet par ailleurs de créer des structures combinant plusieurs types cellulaires.

Comme nous l'avions décrit dans le chapitre bibliographique, la bio-impression 3D est de plus en plus utilisée pour créer des modèles tumoraux. Néanmoins, elle a encore été très peu appliquée aux cancers ovariens.

Dans ce travai de thèse, nous avons souhaité répondre à cette « carence bibliographique ». **Nous avons donc appliqué la bio-impression 3D pour créer un modèle tridimensionnel d'une tumeur épithéliale ovarienne**. Nous avons décrit, dans la première partie du chapitre 2, l'approche méthodologique mise en place pour fabriquer puis caractériser ce modèle.

Dans ce 3ème chapitre, nous allons exposer et discuter les résultats obtenus grâce à cette approche méthodologique. Avant de commencer, rappelons que le travail autour du modèle tumoral bio-imprimé a été organisé en 4 grandes phases :

5. Définition et optimisation de la composition qualitative et quantitative de la bio-encre à utiliser pour la bio-impression 3D ;
6. Conception et optimisation des fichiers informatiques nécessaires à la bio-impression 3D ;

7. Bio-impression des modèles tumoraux ;
8. Caractérisation des modèles tumoraux.

Ce chapitre sera structuré autour de ces quatre grandes phases. Nous décrirons et discuterons les résultats obtenus pour chacune d'elles. Ensuite, nous évoquerons les limites de cette étude avant de conclure ce chapitre.

I. Résultats et discussion

I.1. Définition et optimisation de la formulation de la bio-encre

L'un des avantages de la bio-impression est sa capacité à utiliser une grande variété de bio-encres. Il est cependant très important de pouvoir définir la bonne formulation de bio-encre en fonction de l'application envisagée.

Rappelons qu'une bio-encre est un mélange de cellules incorporées dans un hydrogel de molécules biocompatibles. Nous allons commencer par décrire les résultats relatifs à la partie « hydrogel » de notre bio-encre.

I.1.1. Formulation qualitative de l'hydrogel

Pour la formulation qualitative de notre hydrogel, nous avons choisi une combinaison de gélatine et d'alginate de sodium. Ces deux molécules, initialement en poudres, ont été dissoutes dans un solvant aqueux qui est le milieu complet DMEM.

- **Justification du choix de la gélatine et de l'alginate de sodium**

Ce choix peut être justifié par plusieurs arguments :

- ✓ Biocompatibilité de la gélatine et d'alginate de sodium[1] ;
- ✓ Possibilité **d'ajuster les propriétés rhéologiques (et donc l'imprimabilité)** des hydrogels d'alginate et de gélatine en modifiant **les concentrations** respectives de ces deux molécules[2] ;
- ✓ La gélatine est issue de l'hydrolyse partielle du **collagène** qui est un composant majeur de la matrice extracellulaire. Elle possède de ce fait la propriété de faciliter l'adhésion et la prolifération cellulaires[2]. La structure de la gélatine comprend en effet des séquences arginine – glycine – acide aspartique (RGD) qui sont reconnues par les intégrines (récepteurs intervenant dans l'adhésion cellulaire)[3] ;

- ✓ L'incorporation d'alginate de sodium dans les bio-encres permet une réticulation facile et rapide des structures bio-imprimées[1]. Ceci se fait en utilisant des solutions d'ions divalents comme le calcium, le magnésium ou le zinc. Le composent le plus utilisé étant le chlorure de calcium $CaCl_2$;
- ✓ Le faible cout de ces réactifs : paramètre crucial notamment pour les phases d'optimisation.

Remarque : Pourquoi ne pas avoir utilisé du collagène de type I ?

Le collagène de type I est le constituant majoritaire de la matrice extracellulaire ovarienne[4]. D'un point de vue scientifique, il aurait été pertinent de l'utiliser comme composant majoritaire dans la formulation de notre hydrogel.

Néanmoins, le collagène 1 (sans addition d'autres molécules) ne possède pas les propriétés rhéologiques compatibles avec la bio-impression par extrusion. De plus, ce choix n'était pas viable d'un point de vue économique considérant le contexte du projet :

- ✓ D'un côté, le collagène I est un réactif beaucoup plus coûteux que la gélatine. A titre d'exemple, le collagène I bovin (Sigma) coûte 370 € pour 10 grammes (soit 37 €/g). La gélatine bovine en poudre ne coute que 244 € pour 500 grammes (soit 0,48 €/g)
- ✓ D'un autre côté, ce projet a été conduit au sein d'une équipe **ne disposant d'aucune expertise préalable en bio-impression**. Le travail d'optimisation a donc été long et son impact économique devait être contrôlé.

Ainsi, la gélatine a finalement été retenue pour mener ce projet.

- ➢ **Justification du choix du solvant**

Nous avons décidé d'utiliser un milieu de culture complet comme solvant (au lieu d'utiliser de l'eau distillée ou du PBS). L'idée était d'apporter des nutriments dans l'environnement immédiat des cellules pour favoriser la viabilité cellulaire.

C'est le milieu complet DMEM (milieu de culture des SKOV-3) qui a été utilisé au cours des premières phase d'optimisation de l'hydrogel. Ce choix s'explique par la chronologie de déroulement du projet. Quand celui-ci a débuté, les cellules SKOV-3 avaient déjà été

identifiées commet allant faire partie du modèle. Le deuxième type cellulaire n'avait pas encore été sélectionné.

I.1.2. Formulation quantitative de l'hydrogel

Il s'agissait ici de définir les concentrations d'alginate et de gélatine à utiliser pour avoir un hydrogel imprimable à 37°C et à une pression d'extrusion inférieure ou égale à 20 kPa. Plusieurs solutions ont donc été préparées et évaluées.

Avant d'exposer les résultats obtenus, un point important doit être souligné pour permettre au lecteur de mieux comprendre notre stratégie d'optimisation. Dans notre hydrogel, c'est la gélatine est qui est le composé « biologiquement actif ». Elle favorise en effet l'adhésion et la prolifération cellulaires[2]. L'alginate est un acteur dont le rôle se résume à permettre la réticulation des structures bio-imprimées. La gélatine devait donc être le composant majoritaire de l'hydrogel.

Voilà pourquoi nous avons préparé deux groupes de solution avec des concentrations en alginate à 1% et 2% respectivement et des concentrations croissantes en gélatine (cf. Chapitre 2 : Tableau 2.2).

Les solutions préparées ont d'abord été observées pour évaluer leur capacité à former des hydrogels à température ambiante. **Toutes sont restées totalement liquides sauf les trois suivantes : (1% SA + 15% G) ; (2% SA + 13% G) et (2% SA + 15% G)**.

Ces 3 solutions ont formé des hydrogels à température ambiante. Elles ont donc été testées pour évaluer leur imprimabilité à 37°C. Les résultats obtenus sont illustrés par la Figure 3.28.

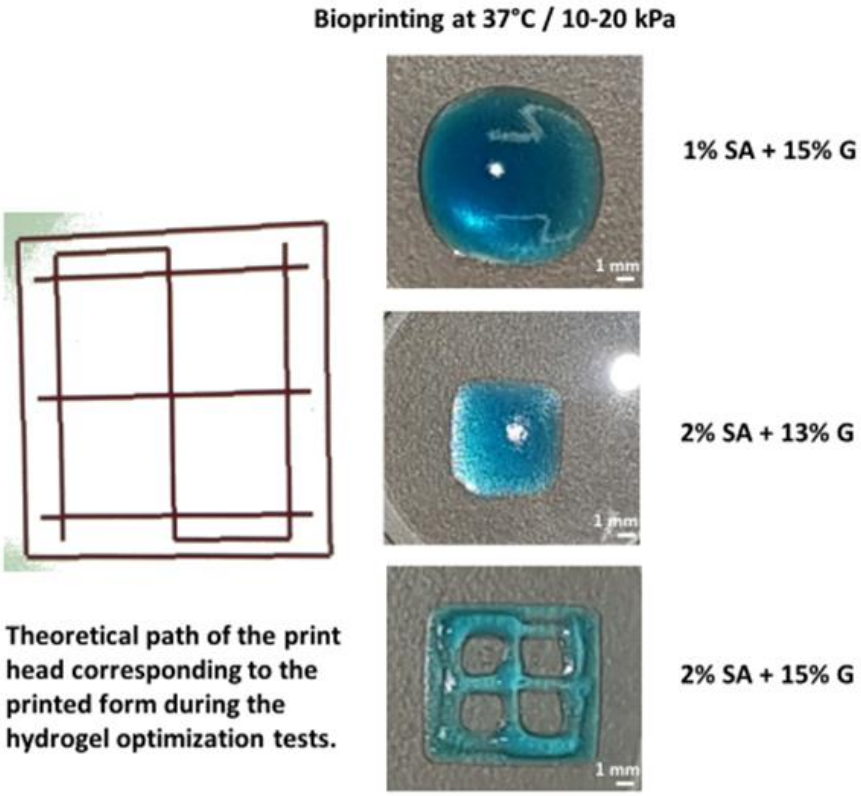


Figure 3.28. Résultats des essais d'impression réalisés durant la phase d'optimisation de l'hydrogel[5]. Les formulations à (1% SA + 15% G) et (2% SA + 13% G) étaient trop liquides et non imprimables à 37°C. La formulation à 2% SA + 15% G était, quant à elle, imprimable à 37°C. Elle a donc été sélectionnée pour la suite de l'étude. Les solutions ont été colorées en bleu pour une meilleure appréciation visuelle. Trois expériences indépendantes ont été réalisées. Des images représentatives sont fournies dans cette figure. Barre d'échelle = 1mm.

On peut voir que les solutions (1% SA + 15% G) et (2% SA + 13% G) n'étaient pas imprimables à 37°C. Elles devenaient trop liquides et ne permettaient pas de reproduire la forme théorique à imprimer.

En revanche, la solution à (2% SA + 15% G) a permis de bien reproduire la forme à imprimer. Elle s'imprimait par ailleurs à une pression d'extrusion comprise entre 10 et 20 kPa. Cette formulation a donc été retenue pour réaliser la suite des expérimentations.

I.2. Optimisation des fichiers informatiques nécessaires à la bio-impression

Dans un premier temps, nous avons dessiné sur la plateforme Onshape un objet cylindrique de 7 mm de diamètre et de 1,5 mm de hauteur. Celui-ci a été exporté sous forme de fichier

.stl et intégré à la base de données de la bio-imprimante. Nous l'avons ensuite utilisé pour la bio-impression. Le résultat obtenu est illustré par la Figure 3.29.

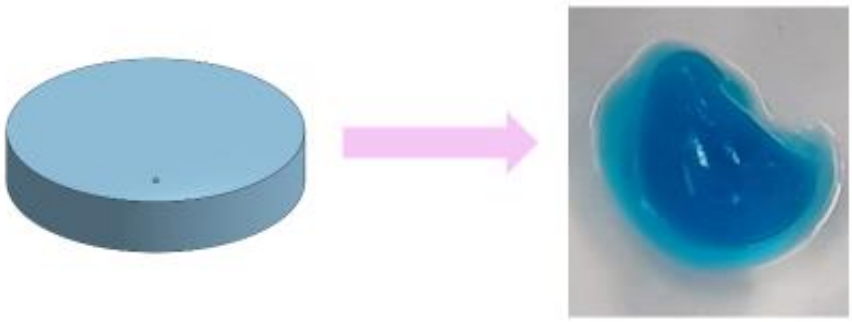


Figure 3.29 . Résultat d'Impression à partir d'un fichier .stl. A gauche, on peut voir l'objet 3D conçu sur Onshape et exporté sous format .sti (Cylindre de 7 mm de diamètre et de 1,5 mm de hauteur). A droite, on peut voir le résultat d'impression obtenu à partir de ce fichier. Les structures obtenues présentaient un manque de matière en haut à droite. Plusieurs expériences ont été réalisées. Une image représentative est fournie sur cette figure.

Sur la Figure 3.29, on peut voir que la forme obtenue via cette approche n'était pas parfaitement circulaire. Il y avait en particulier un manque récurrent de matière en haut à droite des structures fabriquées.

Face à cette observation, nous avons d'abord pensé à un défaut d'optimisation des paramètres d'impression. Mais, ces mêmes paramètres permettaient d'imprimer correctement des structures pré-enregistrées sur la bio-imprimante.

Nous avons alors suspecté un problème sur le fichier .gcode généré par la bio-imprimante à partir de notre fichier .stl. Pour explorer cette hypothèse, le fichier .gcode en question a été extrait de la bio-imprimante et simulé sur le logiciel CAMotics.

En soit, un fichier .gcode est un fichier texte comportant plusieurs dizaines de lignes de code. Mais le logiciel CAMotics permet de le simuler sous une forme plus « visuelle ». Il reconstitue le trajet théorique de la tête d'impression correspondant au fichier .gcode simulée. Ceci permet de visualiser les déplacements de la tête d'impression au cours de la réalisation de l'objet.

Le résultat de la simulation du fichier .gcode généré par la bio-imprimante à partir de notre fichier .stL est illustré par la Figure 3.30 .

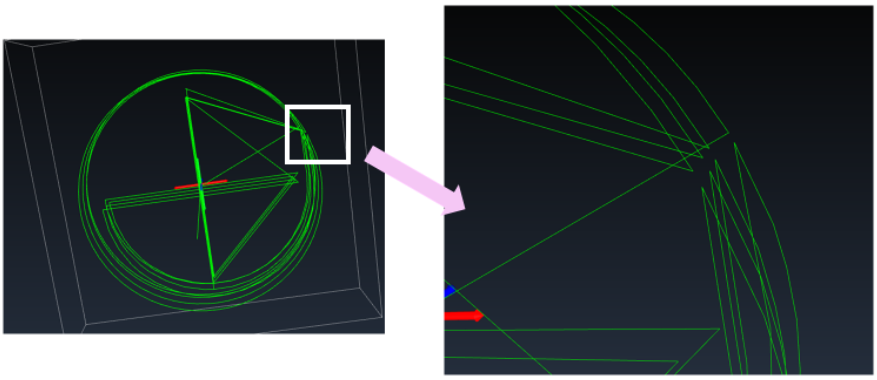


Figure 3.30. Simulation CAMotics du fichier .gcode généré par la bio-imprimante à partir de notre fichier .stl initial.

Sur cette simulation, plusieurs observations peuvent être faites :

- ✓ La tête d'impression ne passe pas de manière homogène sur toutes les parties de la structure ;
- ✓ On peut observer une interruption de la trajectoire en haut à droite de la structure. La tête d'impression ne dessine pas des cercles continus.

On a alors pensé que ces « défauts » dans le fichier .gcode pouvaient être à l'origine des manques de matière observés sur les structures bio-imprimées.

Pour tester cette hypothèse, nous avons entrepris un travail d'optimisation du fichier .gcode initial.

L'idée était de garder le support et le cadre de lecture du fichier initial mais de modifier les coordonnées de la trajectoire de la tête d'impression. Nous avons généré une nouvelle série de coordonnées permettant d'avoir une trajectoire en plusieurs cercles concentriques.

Cette opération s'est faite en plusieurs étapes. A chaque fois, les nouveaux fichiers .gcode générés étaient simulés sur CAMotics avant d'être utilisés pour la bio-impression.

La simulation CAMotics du fichier obtenu à l'issue de cette phase d'optimisation et la structure résultante sont illustrés par la Figure 3.31.

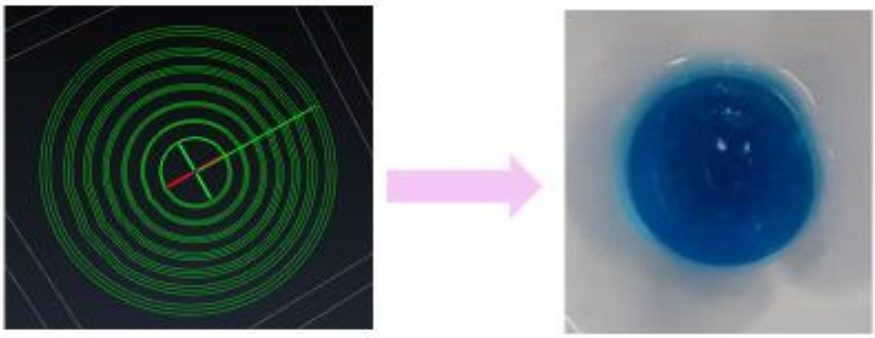


Figure 3.31. Fichier .gcode obtenu à l'issue de la phase d'optimisation (à gauche) et structure bio-imprimée en l'utilisant (à droite). Ce fichier impose à la tête d'impression une trajectoire en cercles concentriques. Il permet de générer des structures sans manque de matière. Plusieurs expériences ont été réalisées. Une image représentative est fournie sur cette figure.

Sur la Figure 3.31, on peut voir que le fichier généré à l'issue de la phase d'optimisation permet de créer des structures avec des contours bien circulaires. Ce fichier a donc été utilisé pour la suite des manipulations.

I.3. Préparation des modèles bio-imprimés

Après avoir défini l'hydrogel et le fichier informatique, l'étape suivante était donc de préparer les modèles tumoraux contenant des cellules. Justement, commençons par discuter des cellules que nous avons utilisées.

I.3.1. Choix des types et des lignées cellulaires

Pour notre modèle tumoral, nous avons choisi de combiner deux acteurs cellulaires : des cellules cancéreuses ovariennes et des fibroblastes cancéreux (CAFs). Les CAFs sont en effet un acteur majeur du microenvironnement tumoral ovarien. Ils jouent notamment un rôle clé dans les processus métastatiques[6] et les phénomènes de chimiorésistance[7].

En termes de lignées cellules, les cellules SKOV-3 ont été sélectionnées comme cellules cancéreuses ovariennes. Elles sont souvent utilisées dans les modèles 3D de cancers ovariens[8,9]. Par ailleurs, elles ont été préalablement utilisées au sein de l'équipe pour d'autres projets[10] dont celui-ci constitue la continuité.

Les cellules MeWo ont été utilisées comme fibroblastes cancéreux (CAFs). Leur usage en tant que tels dans des modèles tumoraux en 3D a été décrit dans la bibliographie[11].

I.3.2. Les vérifications préalables à la bio-impression

- **Impact du solvant sur l'imprimabilité**

Comme expliqué dans le chapitre méthodologique, le DMEM a été utilisé comme solvant au cours de la phase d'optimisation. Ensuite au moment d'imprimer les structures avec cellules, nous avons dû adapter le solvant en fonction de la composition cellulaire de la bio-encre. Plusieurs expériences nous ont permis de nous rendre compte que les solvants (DMEM complet) ; (MEM complet) et (DMEM + MEM) donnaient les mêmes résultats en termes d'imprimabilité de l'hydrogel.

- **Cohabitation des deux types cellulaires**

Nous avons co-cultivé des cellules SKOV-3 et des MeWo (ratio 1:1) et observé leur comportement sur 7 jours. Les résultats obtenus sont illustrés par la Figure 3.32.

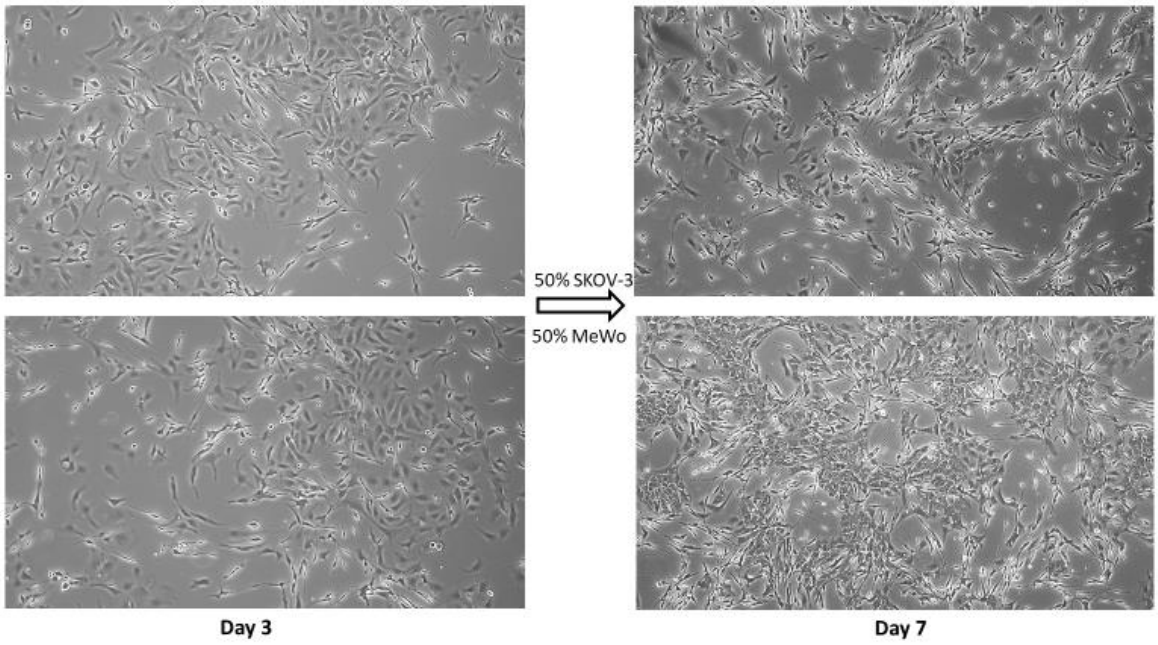


Figure 3.32. Coculture en 2D des deux types cellulaires.

La Figure 3.32 monte que les deux types cellulaires restaient mélangés à J+3 et J+7. Il ne semble pas y avoir une séparation des deux populations cellulaires.

I.3.3. Bio-impression des structures contenant des cellules

Pour bio-imprimer les structures avec cellules, nous avons utilisé l'hydrogel à (2% SA + 15% G). Pour former la bio-encre bicellulaire, nous y avons incorporé les cellules SKOV-3 et MeWo de telle sorte à avoir une concentration totale à 10^6 cellules / mL de bio-encre. La Figure 3.33

récapitule le déroulement de la manipulation de bio-impression et illustre une photo des structures bio-imprimées.

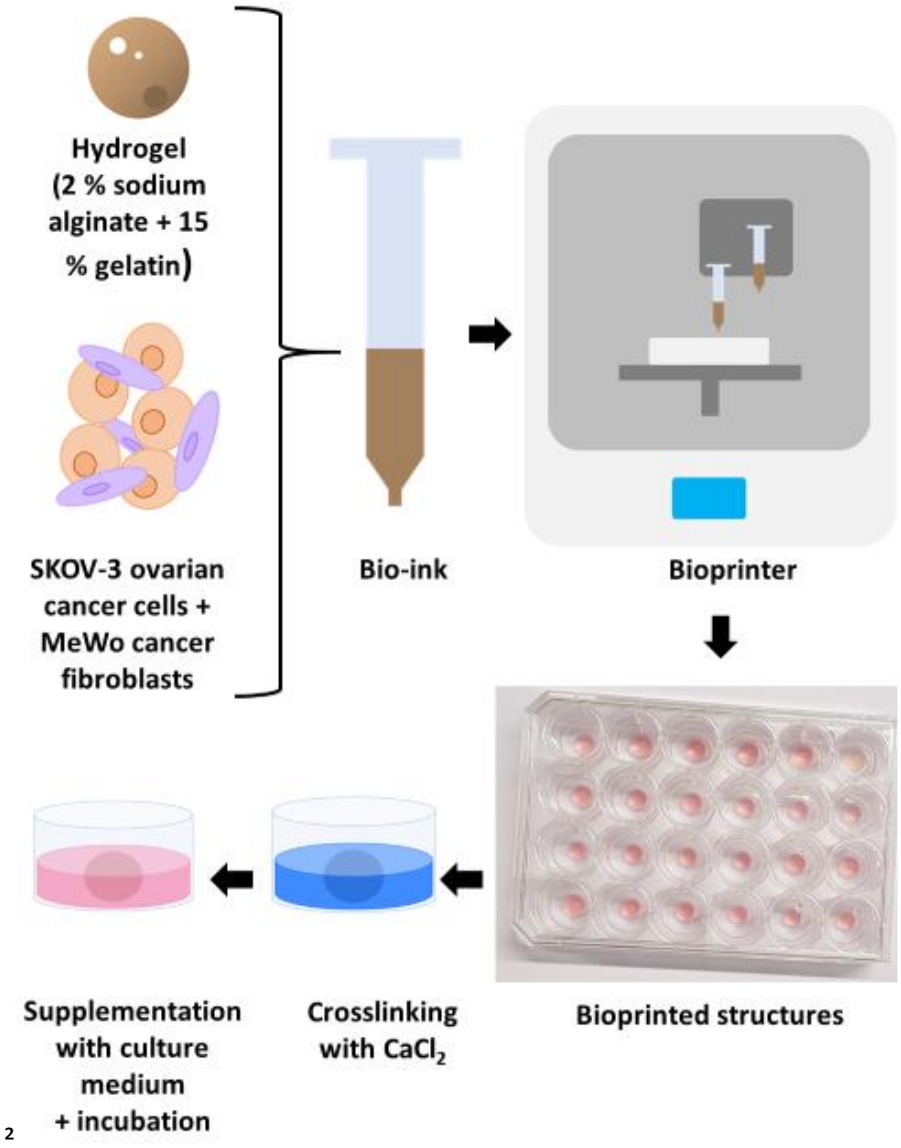


Figure 3.33. Déroulement des manipulations de bio-impression et photo des structures bio-imprimées[5].

Pour chaque manipulation, l'utilisation de **3 mL** de bio-encre permet de préparer pas moins de **48 structures.** Par ailleurs, la manipulation dans son intégralité (depuis la trypsination des cellules jusqu'à la mise en culture des structures bio-imprimées) ne dure pas plus de **4 heures**.

Au regard de ces données, on peut dire que l'approche basée sur l'usage de ces modèles bio-imprimés est rapide à mettre en place. Elle permet également la réalisation simultanée d'un grand nombre de tests différents. Si on considère 3 structures bio-imprimées par condition

(un médicament ou une concentration donnée), une seule manipulation permet de générer suffisamment de structures pour évaluer 16 conditions différentes. Ce modèle permet donc une bonne efficacité lors de la réalisation des tests de cytotoxicité.

Cette approche est aussi **avantageuse sur le plan économique**. En dehors de l'investissement nécessaire à l'acquisition de la bio-imprimante, aucun milieu ou facteur de croissance spécifique n'est requis. Sur le long terme, cette approche devient donc moins couteuse que d'autres technologies comme celle des organoïdes par exemple.

I.4. Caractérisations biologiques des structures bio-imprimées

I.4.1. Evaluation de la viabilité cellulaire

Une première évaluation de la viabilité cellulaire a été effectuée par la technique Live/Dead couplée à l'observation en microscopie confocale. Les résultats obtenus sont illustrés par la Figure 3.34.

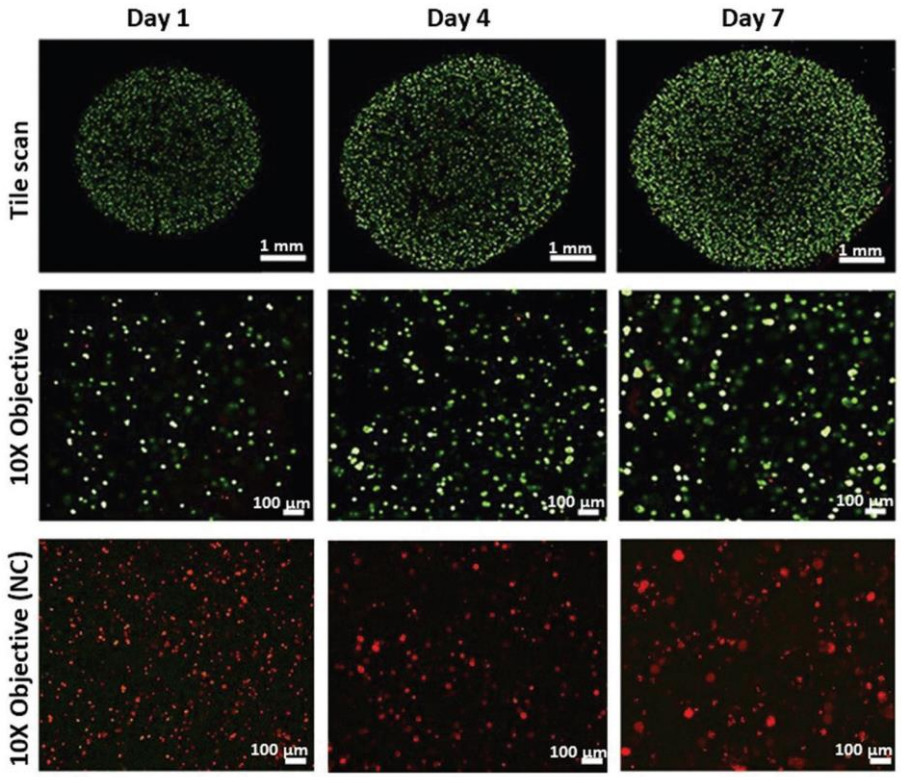


Figure 3.34. Evaluation de la viabilité cellulaire par la technique Live/Dead couplée à la microscopie confocale[5]. Les cellules vivantes émettent une fluorescence verte alors que les cellules mortes émettent une fluorescence rouge. Le contrôle négatif (NC) correspond à des structures ayant été traitées au méthanal à 70% pendant 30 minutes. Les « tile scan » sont générées par la combinaison d'images obtenues sur plusieurs champs microscopique à l'objectif 10X de telle sorte à reconstituer une vue d'ensemble des structures bio-imprimées. Trois expériences indépendantes ont été réalisées. Des images représentatives

sont fournies sur cette figure. La barre d'échelle correspond à 1 mm sur le panel supérieur et à 100 µm sur les deux panels inférieurs.

L'observation de la Figure 3.34 permet de constater, à J+1, une très nette prédominance des cellules émettant une fluorescence verte (cellules vivantes). Ceci illustre une bonne préservation de la viabilité cellulaire après bio-impression. La même tendance est observée à J+4 et à J+7. La viabilité cellulaire semble donc se maintenir jusqu'au 7ème jour après bio-impression.

L'observation des images « tile scan » permet aussi de constater que **l'essentiel de la fluorescence verte (cellules vivantes) se concentre à la périphérie des structures bio-imprimées**. On observe en effet une forte densité cellulaire en périphérie alors que le centre semble « moins peuplé ».

Cette distribution majoritairement périphérique des cellules est **déjà visible à J+1**. Elle semble **se maintenir voire se renforcer à J+4 et J+7**. Pour expliquer cette observation, nous pouvons avancer deux hypothèses :

- ✓ La pénétration non homogène des réactifs du kit au sien des structures bio-imprimées. Les cellules au centre pourraient être moins exposées à la calcéine-AM que celles à la périphérie ;
- ✓ La formation d'une **région hypoxique** au centre des structures bio-imprimées. Ceci peut être dû à une moindre exposition à l'oxygène et aux nutriments des cellules dans la région centrale.

Finalement, les deux hypothèses se rejoignent d'une certaine façon pour dire que la diffusion de l'oxygène, des nutriments et des réactifs serait moindre dans les régions centrales.

A partir de là, une autre question peut alors se poser : **la présence de ce supposé cœur hypoxique est-elle une bonne ou une mauvaise chose ? est-ce un point positif ou négatif par rapport à la pertinence biologique de notre modèle ?**

Dans cette étude, nous ne prétendons pas pouvoir apporter une réponse définitive à cette question. Il convient néanmoins de rappeler que la présence d'un cœur hypoxique est une caractéristique fréquente des tumeurs solides[12]. Celui-ci jouerait même un rôle important

dans la physiopathologie des maladies cancéreuses en favorisant, notamment, la chimiorésistance[12].

I.4.2. Mesure de l'activité métabolique au sein des structures bio-imprimées

A travers la technique Live/Dead, nous avons eu une **évaluation qualitative** de la viabilité cellulaire et de son évolution en fonction du temps. Nous avons ensuite souhaité effectuer une évaluation quantitative de **l'activité métabolique** des cellules au sein des structures bio-imprimées. Celle-ci a été mesurée via les techniques WST-1 et AlamarBlue.

A ce niveau, il convient de préciser que l'activité métabolique et la viabilité cellulaire sont deux notions différentes. Les cellules viables sont métaboliquement actives. Néanmoins, une augmentation de l'activité métabolique n'implique pas nécessairement une augmentation de la viabilité cellulaire[13].

Pour mesurer l'activité métabolique des cellules au sein des structures bio-imprimées, nous avons mis en place deux protocoles : un protocole avec élimination de la matrice avant traitement au réactif et un protocole avec élimination de la matrice après traitement au réactif.

- **Le protocole avec élimination de la matrice avant traitement au réactif**

Ce protocole a été appliqué uniquement pour le réactif WST-1. Les résultats obtenus sont présentés par la Figure 3.35.

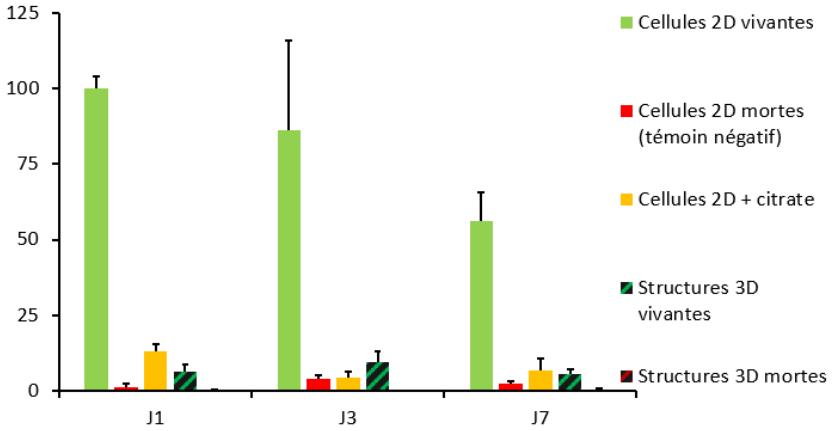


Figure 3.35. Première évaluation de la viabilité cellulaire par la technique WST-1. Les cellules en 3D ont été exposées au réactif après élimination de la matrice. Les résultats sont exprimés en pourcentage de viabilité cellulaire par rapport au contrôle positif (Cellules en 2D à J+1). Les contrôles négatifs ont été obtenus par traitement des cellules au

méthanol à 70% pendant 30 minutes. Les valeurs illustrées pour chaque groupe d'échantillons représentent la moyenne de viabilité sur 4 réplicas techniques. Les barres d'erreur correspondent aux écart types calculés sur les résultats des différents réplicas techniques. Un seul réplica biologique a été réalisé pour cette expérience.

Comme on peut le voir sur la Figure 3.35, la viabilité cellulaire des structures bio-imprimées était très faible sur les 3 points de temps évalués (6,33% ± 2,21% à J+1 ; 9,32% ± 3,57% à J+3 et 5,28% ± 1,77% à J+7). Or on remarque également une forte diminution de la viabilité des cellules en 2D traitées au citrate de sodium pendant 1h15 minutes (12,91% ± 2,48% à J+1 ; 4,37% ± 1,85% à J+3 et 6,73% ± 3,92% à J+7).

On peut alors logiquement conclure que la faible viabilité mesurée au sein des structures bio-imprimées était due au traitement au citrate de sodium visant à éliminer la matrice. Ce protocole semblait donc non approprié car il donnait des résultats biaisés. C'est pour cette raison qu'il n'a été tenté qu'une seule fois (un seul réplica biologique).

L'impact de la solution de citrate de sodium sur l'activité métabolique pourrait être dû à son pH faiblement basique (entre 8 et 8,5). Les réactions enzymatiques étant pH-dépendantes, elle peuvent être inhibées par un pH basique.

- **Le protocole avec élimination de la matrice <u>après</u> traitement au réactif**

Après avoir constaté l'échec du premier protocole, nous avons dû développer une autre approche. Cette fois, l'idée était d'incuber les structures 3D avec le réactif (WST-1 ou AlamarBlue) sur une longue durée de temps (5 heures) pour permettre sa diffusion dans la matrice. Cette dernière n'était éliminée qu'à la fin de l'incubation pour libérer le produit coloré qui s'était accumulé en son sein.

Les résultats obtenus via cette approche sont illustrés par la Figure 3.36.

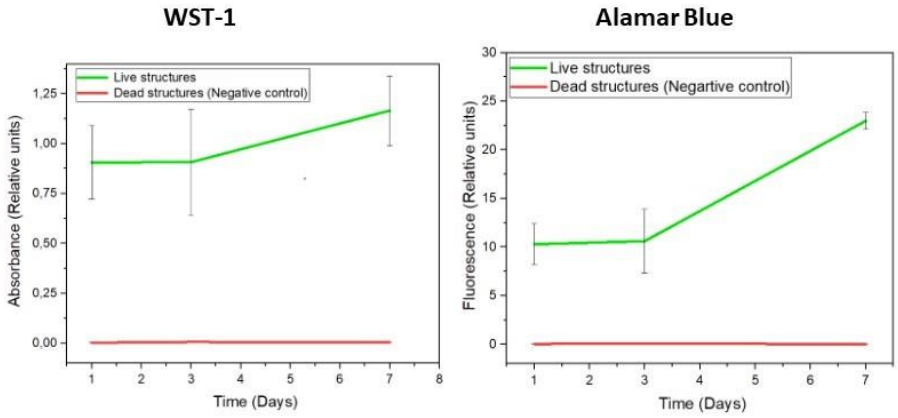


Figure 3.36. Deuxième évaluation de la viabilité cellulaire par les techniques WST-1 et AlamarBlue[5]. Les mesures ont été faites sur des structures contenant des cellules SKOV-3 (0,5 x 10^6 Cell./ mL de bio-encre) et des cellules MeWo (0,5 x 10^6 Cell./ mL de bio-encre) (soit une concentration cellulaire totale à 10^6 Cell./ mL de bio-encre). Les contrôles négatifs correspondent à des structures traitées au méthanol à 70% pendant 30 minutes. Les résultats sont exprimés en absorbance mesurée à 450 nm (Unités relatives) pour le WST-1 et en fluorescence (Ex/Em = 544/590 nm) (Unités relatives) pour l'AlamarBlue. Les valeurs tracées correspondent aux moyennes calculées sur 3 expériences indépendantes (3 réplicas biologiques). Les barres d'erreurs correspondent aux écart types calculés sur les 3 expériences.

En analysant la Figure 3.36, plusieurs résultats peuvent être soulignés. A J+1, l'activité métabolique au sein des structures vivantes était largement supérieure à celle des structures mortes (contrôle négatif). Cette observation est valable aussi bien pour les résultats issus de technique WST-1 que pour ceux issus de la technique AlamarBlue. A J+1, l'absorbance mesurée à 450 nm via la technique WST-1 était de 0,9 ± 0,1 (unités relatives d'absorbance ou URA) pour les structures vivantes versus 0,003 ± 0,001 URA pour le contrôle négatif. La fluorescence mesurée via la technique AlamarBlue était de 10,4 ± 2,1 (Unités relatives de fluorescence ou URF) pour les structures vivantes versus 0,004 ± 0,001 URF pour le contrôle négatif.

Cette différence d'absorbance ou de fluorescence entre le contrôle négatif et les structures vivantes démontre, pour ces dernières, une forte activité métabolique et donc une bonne viabilité cellulaire à J+1. Nous pouvons en conclue que le processus de bio-impression n'affecte pas la viabilité cellulaire. Par ailleurs, ces mesures confirment les premières observations faites via la technique Live/Dead.

A J+3, l'activité métabolique se maintient quasiment au même niveau qu'à J+1. On peut donc en conclure que les structures bio-imprimées maintiennent leur viabilité au cours de cette période de temps.

Une observation plus intéressante a été faite entre J+3 et J+7. On remarque en effet **une augmentation de l'activité métabolique**. Cette augmentation a été mise en évidence aussi bien par la technique WST-1 que par la technique AlamarBlue. En effet, l'absorbance est passée de 0,90 ± 0,2 URA au jour 3 à 1,16 ± 0,1 URA au jour 7 (WST-1). La fluorescence, quant à elle, est passée de 10,6 ± 3,2 URF au jour 3 à 22,9 ± 0,8 URF au jour 7 (AlamarBlue).

Cette augmentation de l'activité métabolique entre J+3 et J+7 pourrait être attribuée à **une augmentation de la population cellulaire** témoignant **de la prolifération cellulaire** au sein des structures bio-imprimées.

I.4.3. Distribution spatiale des cellules dans les structures bio-imprimées

Au-delà de la viabilité cellulaire et de l'activité métabolique, il était important pour nous d'observer la distribution spatiale des cellules au sein de nos modèles tumoraux. Il faut savoir en effet que le microenvironnement tumoral est un milieu complexe où cohabitent plusieurs types cellulaires[14]. Un modèle tumoral doit donc pouvoir restituer cette « proximité » entre les différents acteurs cellulaires.

Pour observer la distribution des 2 types de cellules dans notre modèle nous les avons marqués différemment et utilisés pour préparer des structures bio-imprimées. Celles-ci ont ensuite été observées par microscopie confocale à fluorescence à J+1 après bio-impression. Les résultats obtenus sont illustrés par la Figure 3.37.

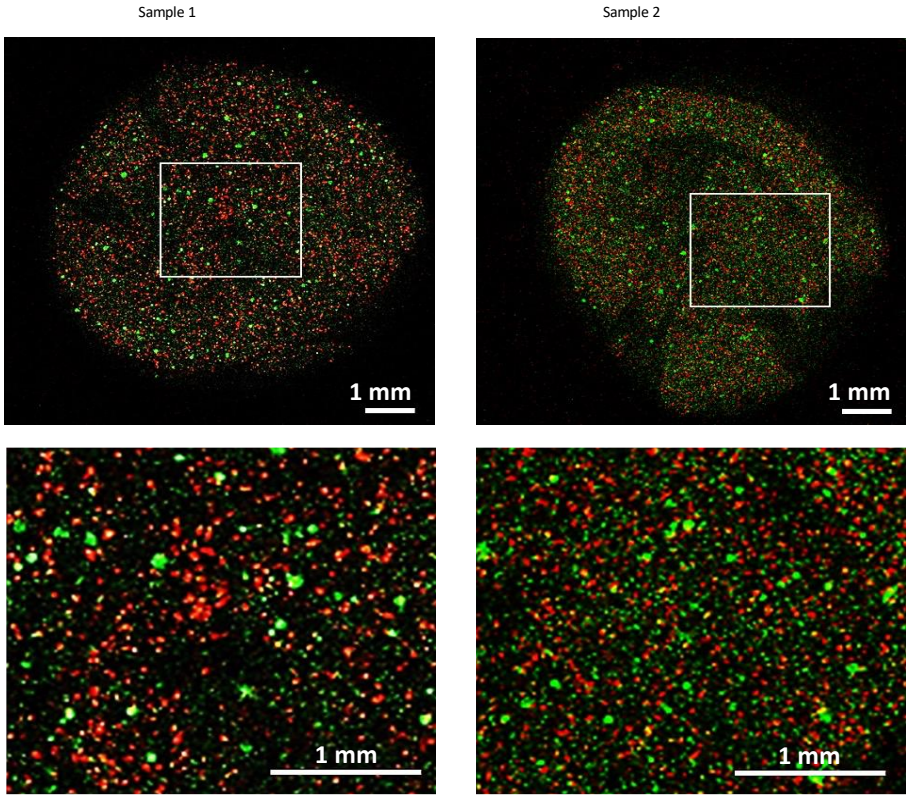


Figure 3.37. Distribution spatiale des cellules dans les structures bio-imprimées[5]. Celles-ci ont été observées en microscopie confocale après marquage différent des deux types cellulaires. Les cellules SKOV-3 ont été marquées en vert (transfectées pour exprimer la Green fluorescent protein ou GFP). Les cellules MeWo ont été marquées en organe (CellTracker™ Orange CMRA). La barre d'échelle correspond à 1 mm dans les deux panels.

Sur la Figure 3.37, on peut remarquer que les SKOV-3 et les MeWo se répartissent de façon homogène au sein des structures bio-imprimées. On remarque également la proximité immédiate entre les deux types cellulaires. On peut donc considérer que notre modèle tumoral offre un environnement favorable à l'interaction entre les cellules cancéreuses et les CAFs.

I.4.4. Analyse histologique

Les analyses histologiques constituent un outil clé en cancérologie. Le type histologique de la tumeur conditionne souvent sa dangerosité et dicte sa prise en charge. Ainsi pour évaluer la pertinence de nos structures bio-imprimées entant que modèles de tumeurs épithéliales ovariennes, nous les avons soumises à une analyse histologique via la coloration HES.

A J+1 après bio-impression, les cellules étaient uniformément réparties au sein de la matrice (gélatine – alginate) comme on peut le voir sur la Figure 3.38A. Ceci nous permet de confirmer

que les cellules ont été encapsulées de façon homogène dans l'hydrogel au moment de la préparation de la bio-encre.

La Figure 3.38B Apporte une autre information très intéressante. On peut y voir **de multiples figures mitotiques** déjà à J+1 après bio-impression. Ceci démontre que les cellules conservent leur capacité proliférative et se multiplient au sein des structures bio-imprimées. Par ailleurs, la présence des figures mitotiques est un élément histologiques caractéristiques du cancer ovarien épithélial de haut grade (HGSC)[15].

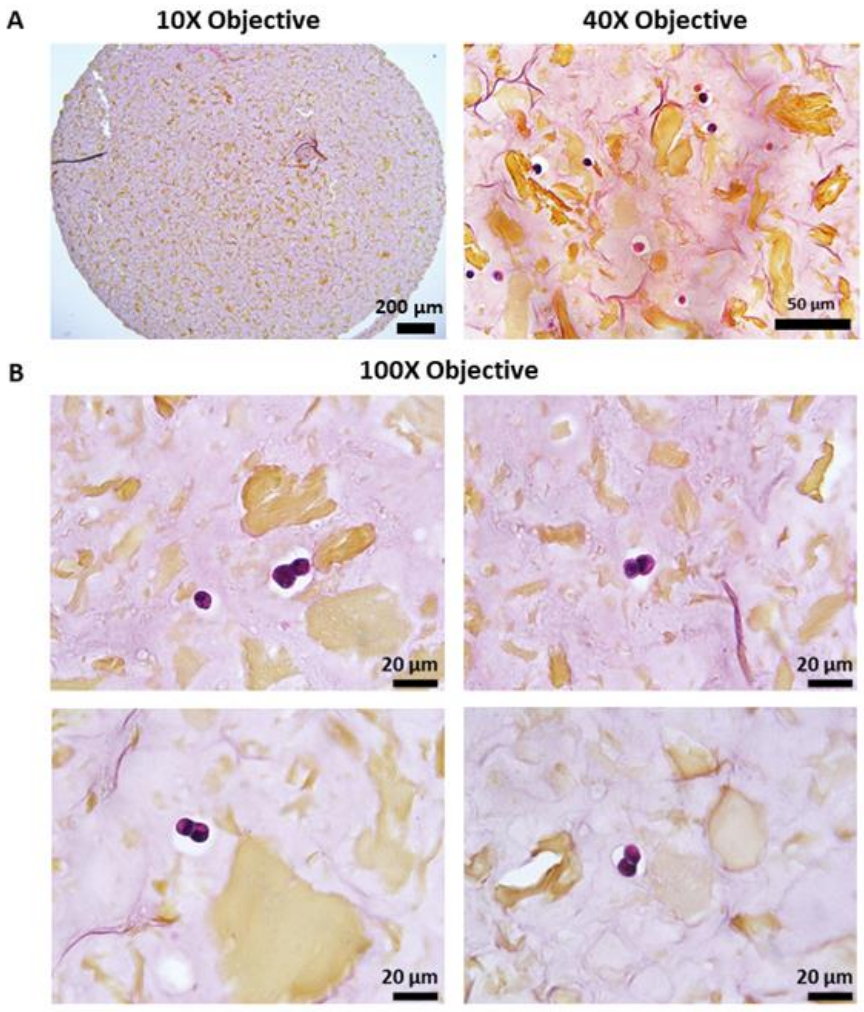


Figure 3.38. Analyse histologique des structures bio-imprimées après coloration HES à J+1 après bio-impression[5]. L'analyse a été réalisée sur des structures contenant des cellules SKOV-3 (0,5 x 10^6 Cell./ mL de bio-encre) et des cellules MeWo (0,5 x 10^6 Cell./ mL de bio-encre) soit une concentration cellulaire totale à 10^6 Cell./ mL de bio-encre. A. on peut observer la distribution homogène des cellules dans la matrice (barre d'échelle = 200 µm). B. Plusieurs figures mitotiques sont présentes à J+1 après bio-impression reflétant la

prolifération cellulaire dans les structures bio-imprimées (barre d'échelle = 20 µm). Trois expériences indépendantes ont été réalisées. Des images représentatives sont fournies sur cette figure.

Après ces premières observations faites à J+1, nous avons prolongé l'analyse histologique jusqu'à J+7 après bio-impression. Les résultats correspondants sont illustrés par la Figure 3.39.

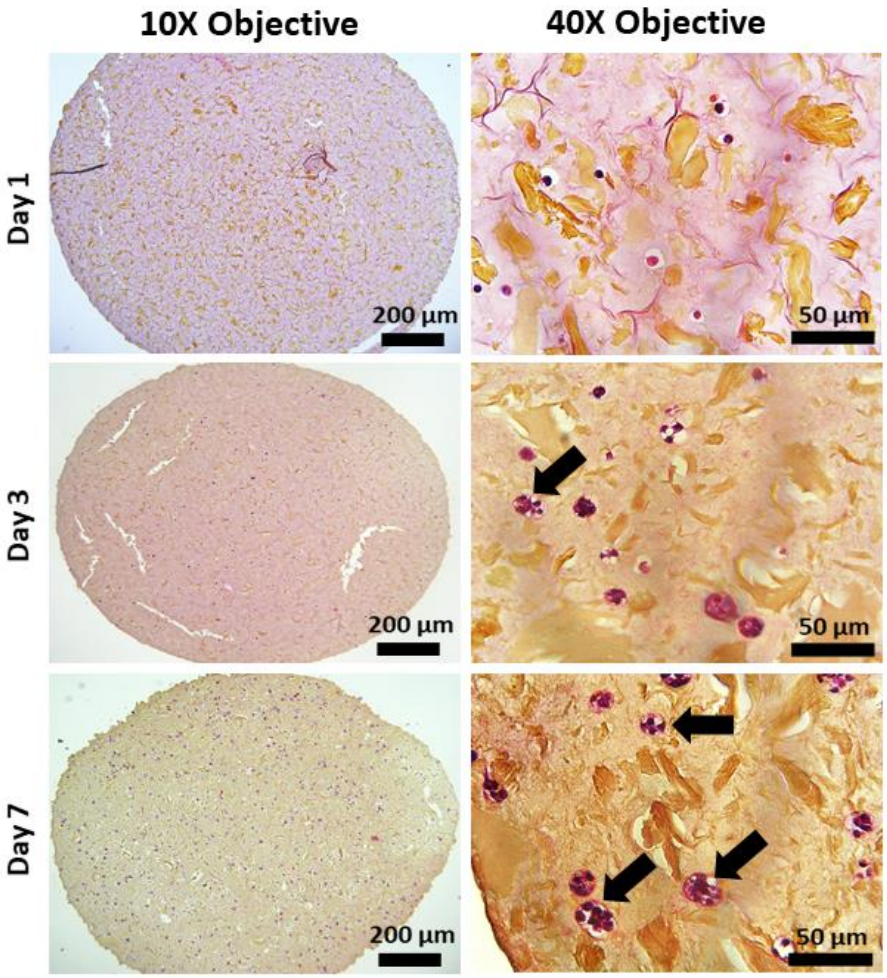


Figure 3.39. Analyse histologique des structures bio-imprimées après coloration HES à J+1 ; J+3 et J+7 après bio-impression[5]. L'analyse a été réalisée sur des structures contenant des cellules SKOV-3 (0,5 x 10^6 Cell./ mL de bio-encre) et des cellules MeWo (0,5 x 10^6 Cell./ mL de bio-encre) soit une concentration cellulaire totale à 10^6 Cell./ mL de bio-encre. A J+3 et J+7, on peut observer la formation d'agrégats cellulaires auto-assemblés au sein de la matrice (flèches noires). Trois expériences indépendantes ont été réalisées. Des images représentatives sont fournies sur cette figure.

A travers la Figure 3.39**,** on peut constater que les cellules s'assemblent spontanément pour former des agrégats. On peut alors observer, sur chaque section, une alternance de zones sans cellules et de zones à forte densité cellulaire correspondant à ces agrégats.

Nous avons ensuite quantifié l'évolution de la taille de ces agrégats en fonction du temps. Compte-tenu de leur forme (ovoïde et non pas parfaitement circulaire), nous avons défini, pour chaque agrégat, deux dimensions : un petit diamètre (SDi pour Small Diameter en anglais) et un grand diamètre (LDi pour Large Diameter en anglais). L'évolution de ces 2 paramètres a ensuite été évaluée en fonction du temps. Les résultats correspondants sont illustrés par la Figure 3.40.

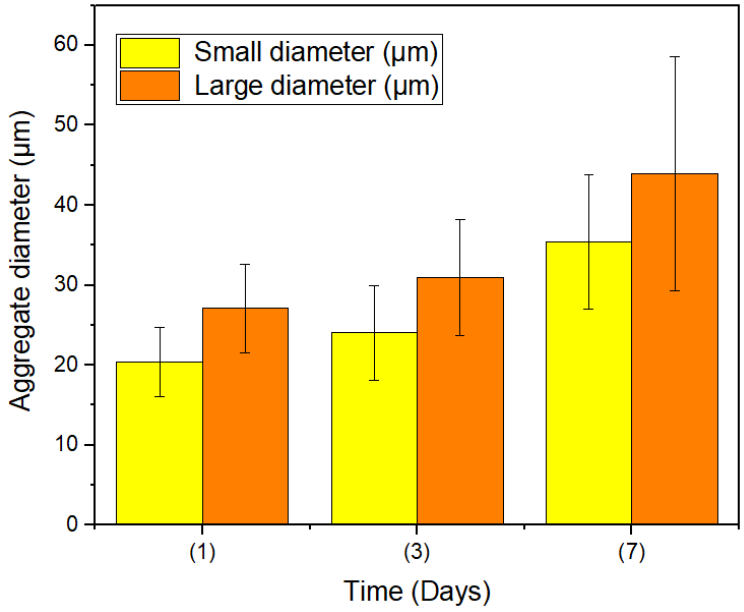


Figure 3.40. Evolution de la taille des agrégats cellulaires en fonction du temps[5]. L'analyse a été réalisée sur des structures contenant des cellules SKOV-3 (0,5 x 10^6 Cell./ mL de bio-encre) et des cellules MeWo (0,5 x 10^6 Cell./ mL de bio-encre) soit une concentration cellulaire totale à 10^6 Cell./ mL de bio-encre. Des images de coloration HES (Objectif 40X) représentatives issues de trois expériences indépendantes ont été utilisées pour faire cette étude. Le petit diamètre (SDi) et le grand diamètre (LDi) de 50 agrégats différents ont été mesurés pour chaque point de temps. Les résultats tracés représentent la valeur moyenne sur les 50 mesures. Les barres d'erreurs correspondent aux écart-types.

Sur la Figure 3.40, on peut constater la progression de la taille des agrégats cellulaires à J+3 et J+7. Le petit diamètre passe de 20,41 ± 4,35 µm (J+1) à 31,41 ± 8,43 µm (J+7). De la même façon, le grand diamètre passe de 27,08 ± 5,53 µm (J+1) à 43,98 ± 14,63 µm (J+7). Cette

progression de la taille s'explique par l'augmentation du nombre de cellules au sein des agrégats comme on peut le voir sur la Figure 3.39.

Cette tendance des cellules à s'autoorganiser en agrégats de plus en plus grands a été décrite par plusieurs autres équipes utilisant la bio-impression 3D pour créer des modèles cancéreux (d'autres types cellulaires et d'autres hydrogels)[16–18]. Ceci semble indiquer que l'environnement tridimensionnel créé par la bio-impression favorise la réorganisation spatiale des cellules cancéreuses[17].

I.4.5. Imagerie longitudinale

A travers l'étude histologique, nous avons observé que les cellules au sein des structures bio-imprimées s'assemblaient pour former des agrégats. Nous nous sommes alors demandé quel était le mécanisme de formation de ces clusters cellulaires. Deux hypothèses ont été émises :

- ✓ Les agrégats se forment suite à des divisions successives *in situ* d'une même cellule (agrégats homotypiques) ;
- ✓ Les cellules migrent (se déplacent) au sien de la matrice pour se rapprocher les unes des autres et former des agrégats potentiellement hétérotypiques.

Pour essayer d'apporter une première réponse à cette question, nous avons intégré dans notre étude une expérimentation d'imagerie longitudinale. Celle-ci n'était pas programmé initialement. Nous l'avons finalement réalisée pour observe les mouvements des cellules au sein des structures bio-imprimées et comprendre ainsi l'origine des agrégats observés en HES.

Pour réaliser l'imagerie longitudinale, les deux types cellulaires ont été marqués différemment avant d'être utilisés pour préparer des structures bio-imprimées. Celles-ci ont ensuite été observées jusqu'à J+7 après bio-impression. Les résultats obtenus sont illustrés par la Figure 3.41.

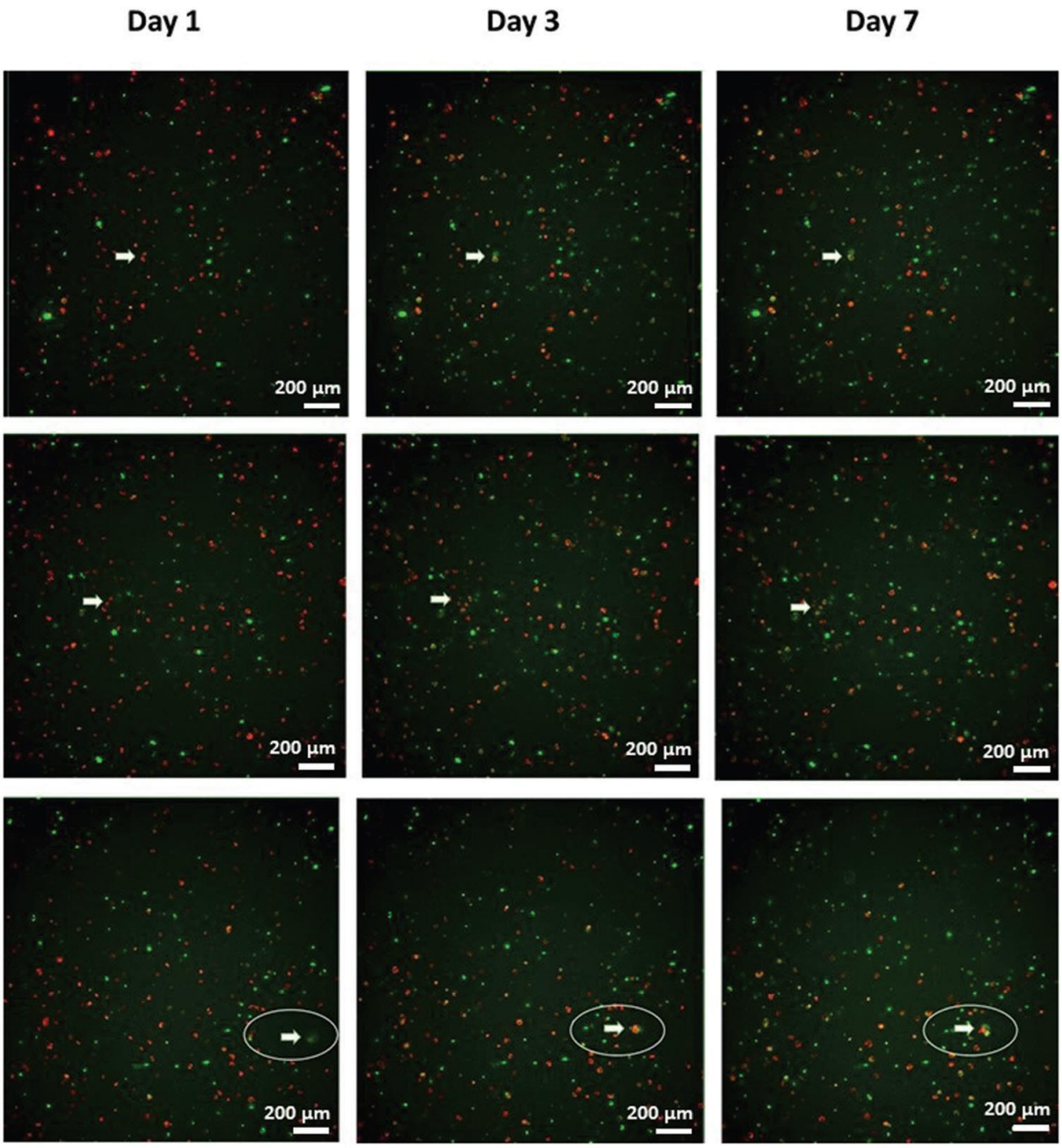


Figure 3.41. Imagerie longitudinale des structures bio-imprimées après marquage différent des deux types cellulaires[5]. Les SKOV3 ont été marquées en rouge et les MeWo en vert. Les trois images de chaque panel ont été obtenues sur une même zone d'observation à des temps différents. Les flèches indiquent les endroits où des modifications en fonction du temps ont été observés. Sur le premier panel par exemple, on peut voir deux points rouges à J+1 (SKOV3) devenir rouge-vert à J+3 et J+7 (SKOV3 + MeWo). Une observation similaire est faite sur le deuxième panel. Sur le troisième panel, on peut observer les mouvements de points verts (MeWo) dans la matrice. Deux expériences indépendantes ont été réalisées. Des images représentatives sont fournies sur cette figure. La barre d'échelle correspond à 200 µm.

En observant la Figure 3.41, on peut noter plusieurs modifications de la distribution cellulaire au cours du temps. On constate en particulier que les MeWo (points verts) initialement non présents apparaissent au voisinage immédiat des SKOV-3 (points rouges) (Figure 3.41, panel 1 et 2). Sur le 3ème panel de la Figure 3.41, on peut avoir un point vert (MeWo) changer de position (Se déplacer) au cours du temps. Bien que ces observations nécessitent d'être complétées, elles permettent d'évoquer de potentiels mouvements cellulaires au sein de la matrice. Comme ce sont les MeWo qui apparaissent au voisinage des SKOV-3, il semble que ce sont eux (MeWo) les plus « mobiles ».

Ce résultat, encore à consolider, nous permet d'avancer des éléments de réponse par rapport à la question relative à l'origine des agrégats cellulaires. Ces derniers seraient issus (en moins en partie) des mouvements des cellules au sein de la matrice. On peut aussi affirmer que les agrégats formés sont (au moins en partie) hétérotypiques (c'est-à-dire comprenant les deux types cellulaires). En effet, comme on a pu l'observer, ce sont les MeWo qui semblent se rapprocher des SKOV-3.

Le résultat de cette expérimentation, même s'il est encore à confirmer, semble aussi indiquer un potentiel caractère biomimétique au sein du modèle tumoral bio-imprimé. Celui-ci semble capable de **reproduire des phénomes observés dans le microenvironnement tumoral *in vivo***. En effet, on sait que, *in vivo*, les CAFs ont tendance à migrer au voisinage immédiat des cellules cancéreuses pour les entourer[19]. Ce phénomène a été décrit comme ayant notamment un rôle dans la chimiorésistance[20]. Il s'agit donc d'un processus physiopathologique important que notre modèle semble être en mesure de reproduire (au moins en partie) à travers le rapprochement entre les MeWo et les SKOV-3.

I.4.6. Marquages immunologiques

Pour compléter et approfondir la caractérisation de notre modèle, nous avons effectué plusieurs marquages immunologiques. Nous avons utilisé l'immunohistochimie pour certains marquages et l'immunofluorescence pour d'autres. L'objectif à travers cela était de s'assurer de l'adaptabilité de notre modèle (c'est-à-dire de la possibilité d'y appliquer plusieurs techniques différentes).

Tous les marquages ont par ailleurs été effectués **à J+7 après bio-impression** sur trois types de structures bio-imprimées : (i) des structures contenant des SKOV-3 et des MeWo (coculture) ; (ii) des structures contenant des SKOV-3 uniquement (monoculture SKOV-3) et

(iii) des structures contenant des MeWo uniquement (monoculture MeWo). Les résultats des marquages immunologiques sont illustrés par la Figure 3.42 (ICH) et la Figure 3.43 (IF) ci-dessous.

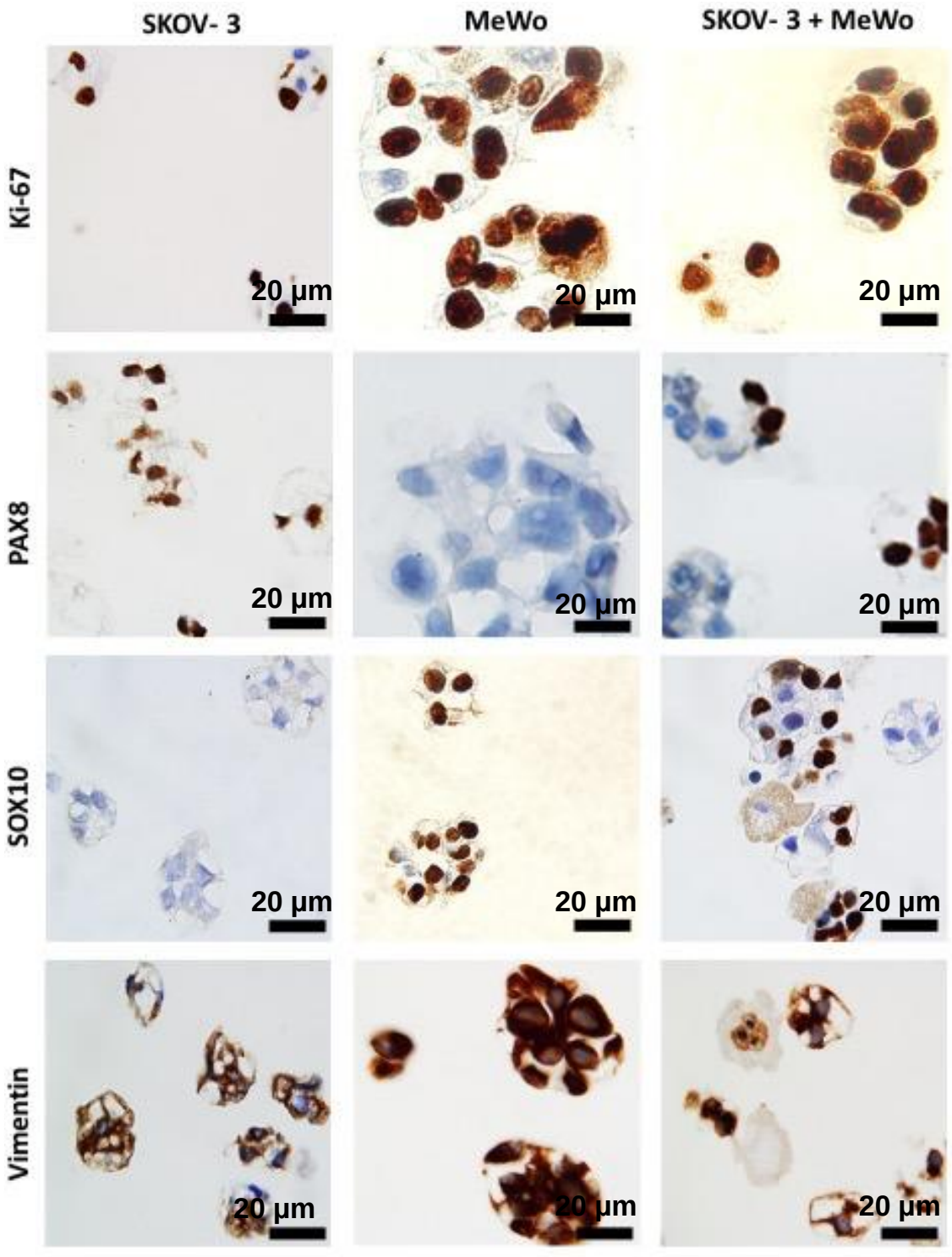


Figure 3.42. Evaluation de différents marqueurs par immunohistochimie à J+7 après bio-impression[5]. Des structures en monoculture (SKOV-3 uniquement) ou (MeWo uniquement) et des structures en coculture (SKOV-3 + MeWo) ont été examinées. Trois expériences

indépendantes ont été réalisées. Des images représentatives sont fournies sur cette figure. La barre d'échelle correspond à 20 µm pour toutes les images.

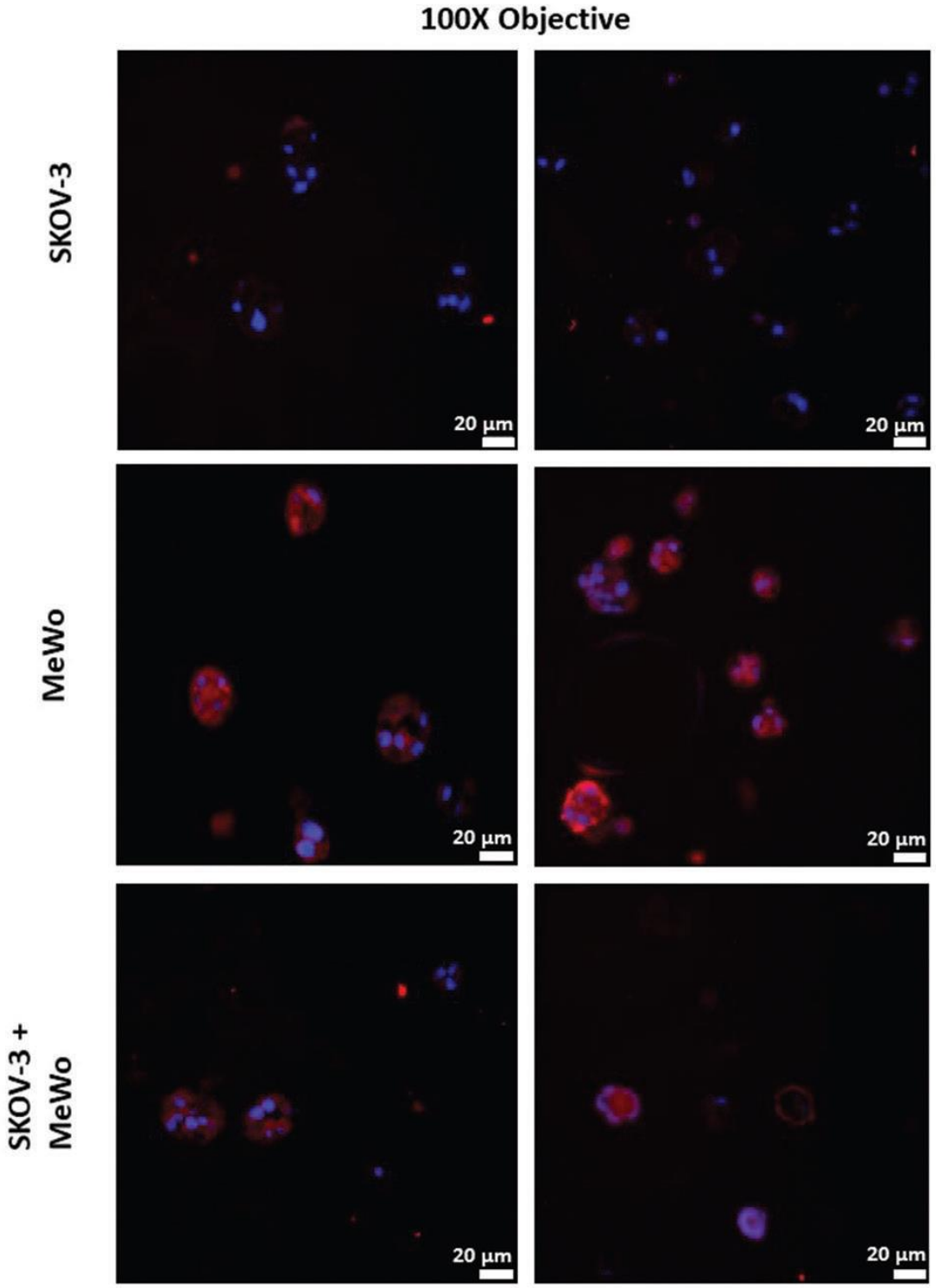


Figure 3.43. Evaluation de l'expression du FAP (Fibroblast Activation Protein) par immunofluorescence sur des sections obtenues à J+7 après bio-impression[5]. La couleur rouge correspond à l'expression de la protéine FAP. La couleur bleue correspond aux noyaux. Des structures en monoculture (SKOV-3 uniquement) ou (MeWo uniquement) et des structures en coculture (SKOV-3 + MeWo) ont été examinées. Trois expériences

indépendantes ont été réalisées. Des images représentatives sont fournies sur cette figure. Les panels de droite et de gauche correspondent à deux zones d'observation différentes. La barre d'échelle correspond à 20 µm pour toutes les images.

Le premier marqueur évalué était le Ki-67. C'est un antigène exprimé par les cellules en cours de prolifération. Il est par ailleurs souvent utilisé en clinique dans la caractérisation du cancer ovarien[15]. Dans notre modèle bio-imprimé, le marquage anti-Ki-67 était positif en monoculture et en coculture (Figure 3.42). Ceci démontre que les cellules conservent leur capacité de prolifération jusqu'au 7ème jour après bio-impression. Ce résultat corrobore aussi les observations faites lors de l'évaluation du métabolisme cellulaire. Les cellules prolifèrent au cours du temps au sein des structures bio-imprimées. Ceci entraine une augmentation de leur nombre et donc l'augmentation de l'activité métabolique.

Nous avons ensuite évalué l'expression du PAX8. C'est un marqueur souvent utilisé en clinique pour caractériser les tumeurs ovariennes[15]. Il est exprimé par tous les cancers ovariens épithéliaux[21]. Dans notre étude, le marquage anti-PAX8 était fortement positif pour les structures contenant des SKOV-3 uniquement et totalement négatif pour les structures contenant des MeWo uniquement (Figure 3.42). Dans la coculture, on a observé des agrégats contenant à la fois des cellules PAX8 positives (SKOV-3) et de cellules PAX8 négatives (MeWo) (Figure 3.42). C'est donc la confirmation que les agrégats observés en HES en coculture sont bien des **agrégats hétérotypiques** où les deux types cellulaires cohabitent en proximité immédiate.

Pour renforcer cette conclusion, nous avons évalué un autre marqueur qui est cette fois spécifique aux cellules MeWo : le marqueur SOX10. C'est un antigène exprimé au sein des mélanomes (cancers de la peau). Nous l'avons choisi car les MeWo sont justement des fibroblastes métastatiques issus d'un mélanome malin. Nous nous sommes d'abord assurés, grâce aux marquages SOX10 en monocultures, que ce marqueur était bien positif pour les MeWo et négatif pour les SKOV-3 (Figure 3.42). En suite et en coculture, nous avons observé des agrégats avec des cellules SOX10 positives (MeWo) et des cellules SOX10 négatives (SKOV-3) (Figure 3.42). Les deux types cellulaires s'organisent donc bien au sein d'agrégats hétérotypiques. On peut en conclure que notre modèle bio-imprimé offre un environnement tridimensionnel favorisant la cohabitation et les interactions entre les cellules cancéreuses et les cellules stromales.

L'expression de la vimentine a également été évaluée dans nos modèles bio-imprimés. C'est une protéine généralement exprimée par les cellules d'origine mésenchymateuse comme les fibroblastes. Dans notre étude, le marquage à la vimentine s'est révélé positif à la fois pour les MeWo (fibroblastes) et pour les SKOV-3 (Figure 3.42). En effet, les SKOV-3 sont connus pour avoir un phénotype épithélio-mésenchymateux caractérisé notamment par l'expression de la vimentine[22]. Cette spécificité est donc bien restituée par notre modèle bio-imprimé.

Enfin, nous avons évalué, par immunofluorescence, l'expression d'un marqueur associé au phénotype CAF : le marqueur FAP. C'est une protéine exprimée par les fibroblastes cancéreux et très souvent utilisée dans leur caractérisation[23]. Dans notre modèle bio-imprimé, Les MeWo ont justement été introduites par jouer le rôle de CAFs. On s'est rendu compte qu'elles exprimaient bien le FAP à la fois en monoculture et en coculture (Figure 3.43).

L'analyse combinée de ces résultats nous permet d'affirmer que notre modèle bio-imprimé préserve bien les marqueurs phénotypiques associés à chaque type cellulaire. Il restitue également des marqueurs clés associés aux tumeurs épithéliales ovariennes et notamment le PAX8. Ce modèle bio-imprimé se prête par ailleurs aussi bien à l'immunohistochimie qu'à l'immunofluorescence.

I.5. Discussion globale

Dans cette étude, la bio-impression 3D a été utilisée pour développer un modèle d'une tumeur ovarienne. L'hydrogel (2% SA + 15% G) a été retenu car il permettait une bonne imprimabilité à 37°C et une faible pression d'extrusion de 10 à 20 kPa. La combinaison de cette formulation d'hydrogel et de ces paramètres d'impression nous a permis de produire des structures avec une très bonne viabilité cellulaire. Ceci a été démontré par la technique Live/Dead et confirmé par la mesure de l'activité métabolique. Cette dernière a même progressé entre J+3 et J+7 laissant supposer un maintien de la prolifération cellulaire au sein des structure bio-imprimée. Cette activité proliférative a d'ailleurs été confirmé par le marquage Ki-67 qui s'est révélé positif en monoculture et en coculture à J+7 après bio-impression.

En plus de maintenir la viabilité et l'activité proliférative des cellules, notre modèle offre un environnement tridimensionnel propice aux interactions intercellulaires. La microscopie confocale nous a permis d'observer la distribution spatiale des cellules au sein des structures bio-imprimés. Nous avons alors eu un premier aperçu de la proximité entre les deux types

cellulaires. Cette proximité a été confirmée grâce aux études histologiques et immunologiques. Celles-ci ont démontré que les cellules s'organisaient en agrégats hétérotypiques dont la taille augmentait au cours du temps. La formation de ces agrégats est due aux mouvements de migration cellulaire et notamment aux MeWo qui se rapprochent progressivement des SKOV-3 reproduisant des comportements décrits *in vivo*.

Grâce aux études immunologiques, nous nous sommes également rendu compte que les cellules conservaient leurs marqueurs phénotypiques au sein des structures bio-imprimées. Notre modèle s'est aussi avéré positif pour un marqueur clé des tumeurs épithéliales ovariennes à savoir le PAX8.

L'ensemble de ces caractérisations permettent donc de bien mettre en lumière la pertinence biologique de notre modèle bio-imprimé.

II. Limites de cette étude et perspectives de recherches associées

Notre étude a permis de démontrer que la bio-impression 3D pouvait être utilisée pour créer des modèles viables de tumeurs ovariennes. Elle comporte néanmoins quelques limites dont nous sommes conscients et qu'il nous faut souligner. Elle soulève par ailleurs quelques questions qui sont autant de nouvelles perspectives de recherche. Dans ce paragraphe, nous allons décrire et discuter les limites de notre étude.

Notre stratégie d'optimisation de l'hydrogel est empirique. En effet, nous nous sommes basés sur une appréciation visuelle du comportement et de l'imprimabilité des hydrogels pour identifier la meilleure formulation. Une caractérisation rhéologique aurait pu être envisagée (mesure de la viscosité, du module de Young etc.). Mais il faut savoir que, dans cette étude, l'hydrogel est un moyen de créer le modèle et non une finalité en soi. De plus, ces études n'auraient pas pu être réalisées à l'Institut Jean Lamour et auraient nécessité des collaborations supplémentaires. Comme il ne s'agissait pas d'un axe de travail prioritaire, nous avons finalement décidé de nous en passer ;

Pour la réticulation de nos modèles bio-imprimés, nous avons utilisé une solution à 100 mM de $CaCl_2$ (exposition pendant 7 minutes). Cette solution est isotonique et n'expose donc pas les cellules à un choque osmotique. Cependant, nous pouvons nous poser la question de savoir

si cette exposition au calcium a un effet sur les différentes voies de signalisation intracellulaire (pouvant ainsi avoir un impact sur les réponses cellulaires aux xénobiotiques). Il s'agit d'un point pouvant donner lieu à une future exploration ;

Le modèle que nous proposons ne comprend que deux types cellulaires (les cellules cancéreuses et les fibroblastes cancéreux). On est donc encore très loin de prendre en compte toute l'hétérogénéité cellulaire du microenvironnement tumoral. Certains acteurs clés ne sont pas représentés dans ce modèle tels que les cellules endothéliales ou les cellules immunitaires. Cependant, il faut aussi souligner que notre modèle est l'un des tous premiers appliquant la bio-impression 3D à des tumeurs ovariennes. Nous avons donc préféré adopter une approche « progressive » en commençant par une coculture. De plus, même si la vascularisation est un élément crucial dans le microenvironnement du cancer ovarien[24], certains processus importants n'en sont pas totalement dépendants. Par exemple, la métastase du cancer ovarien s'effectue majoritairement par voie non-hématogène[25]. Ce que nous voulons dire est que : même dépourvu d'éléments vasculaires notre modèle n'est pas pour autant dépourvu de sens. Enfin, soulignons que d'autres travaux feront suite à ce projet de thèse pour créer des modèles plus aboutis ;

Notre capacité à utiliser ce modèle est également limitée dans le temps. En effet, nos structures bio-imprimées sont très facilement manipulables immédiatement après leur préparation. **Cependant, leur intégrité structurale diminue au fil du temps. Au-delà de 7 jours après bio-impression, elles deviennent très fragiles et donc très difficiles à manipuler** (impossible de transférer une structure d'un support à un autre par exemple). Cette manipulabilité limitée dans le temps rend ces modèles inappropriés à l'étude de certains phénomes évoluant à long terme dans le microenvironnement tumoral. Néanmoins, nous pensons que des études supplémentaires par rapport à la formulation de la bio-encre permettront d'améliorer cet aspect limitant du modèle. C'est d'ailleurs l'une des perspectives de recherche qui peuvent découler de ce projet ;

Quand on observe les coupes histologiques (Figure 3.39), on peut aussi remarquer la faible densité cellulaire au sein de la matrice. Autrement dit, les clusters de cellules sont très « éparpillés » et on a l'impression que la composante matricielle est largement prédominante par rapport à la composante cellulaire. On peut alors se poser la question de savoir à quel point ce modèle reproduit un véritable tissu cancéreux. L'une des solutions à ce problème

aurait été d'augmenter la concentration des cellules dans la bio-encre. Or ceci aurait conduit à une dégradation plus rapide de la matrice après bio-impression et donc à une réduction de la durabilité des structures (qui est déjà limitée). Dans notre étude, nous avions dû trouver un compromis entre ces deux aspects (durabilité et densité cellulaire). En effet, nous avions tenté de bio-imprimer une bio-encre à 2 x 10^6 Cell./mL (au lieu de 10^6 Cell / mL). Or les structures obtenues se dégradaient au bout de 3 à 4 jours seulement. De futures investigations devront permettre d'améliorer cet aspect du modèle ;

Enfin nous devrions également revenir sur le résultat de la manipulation d'imagerie longitudinale (Figure 3.41). Sur chaque champ microscopique, il semble que le nombre de cellules ayant migré est très faible par rapport à la population cellulaire totale. On peut alors se demander pourquoi les mouvements cellulaires sont aussi « peu nombreux » sur chaque champ microscopique. L'une des hypothèses serait que la présence d'alginate dans la matrice entraverait les mouvements cellulaires. En effet, contrairement à la gélatine, l'alginate ne peut pas être dégradé par les enzymes cellulaires (notamment les métalloprotéases). Des études plus approfondies permettront de mieux comprendre et de quantifier les phénomènes de migration cellulaire au sein des structures bio-imprimées.

III. Conclusion du 3ème chapitre

Dans le cadre des efforts visant à développer de nouveaux modèles précliniques en cancérologie, la bio-impression 3D semble être une approche prometteuse. Néanmoins, cette technologie a encore été très peu appliquée au cancer ovarien. A note connaissance, notre étude décrit le premier modèle de tumeur ovarienne bio-imprimée où plusieurs caractérisations biologiques ont été effectuées. Ces caractérisations ont d'abord révélé le maintien de la viabilité et de l'activité proliférative des cellules au sein des structures bio-imprimées. Par ailleurs, nous avons pu constater la capacité des CAFs à migrer au sein de la matrice pour se rapprocher des cellules cancéreuses reproduisant ainsi un comportement décrit *in vivo*. Ces phénomènes de migration conduisent les cellules à s'organiser en agrégats hétérotypiques où elles maintenant l'expression de leurs marqueurs phénotypiques spécifiques. Enfin, le modèle que nous proposons est peu coûteux et peut s'adapter à

plusieurs approches expérimentales utilisées en pratique courante (différents tests de viabilité cellulaire, imagerie confocale, histologie, marquages immunologiques etc.). Ceci en fait un outil très intéressant dans l'évaluation de nouveaux agents thérapeutiques. Ainsi, nous pensons avoir apporté, à travers cette étude, une preuve de l'intérêt de la bio-impression 3D à la modélisation du cancer ovarien.

Références bibliographiques

1. Mondal A, Gebeyehu A, Miranda M, et al. Characterization and printability of Sodium alginate -Gelatin hydrogel for bioprinting NSCLC co-culture. *Sci Rep*. 2019;9(1):19914. doi:10.1038/s41598-019-55034-9

2. Giuseppe MD, Law N, Webb B, et al. Mechanical behaviour of alginate-gelatin hydrogels for 3D bioprinting. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2018;79:150-157. doi:10.1016/j.jmbbm.2017.12.018

3. Kim AY, Kim Y, Lee SH, Yoon Y, Kim WH, Kweon OK. Effect of Gelatin on Osteogenic Cell Sheet Formation Using Canine Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Cell Transplant*. 2017;26(1):115-123. doi:10.3727/096368916X693338

4. Cho A, Howell VM, Colvin EK. The Extracellular Matrix in Epithelial Ovarian Cancer – A Piece of a Puzzle. *Front Oncol*. 2015;5. doi:10.3389/fonc.2015.00245

5. Baka Z, Godier C, Lamy L, et al. A Coculture Based, 3D Bioprinted Ovarian Tumor Model Combining Cancer Cells and Cancer Associated Fibroblasts. *Macromolecular Bioscience*. n/a(n/a):2200434. doi:10.1002/mabi.202200434

6. Zhang Y, Tang H, Cai J, et al. Ovarian cancer-associated fibroblasts contribute to epithelial ovarian carcinoma metastasis by promoting angiogenesis, lymphangiogenesis and tumor cell invasion. *Cancer Lett*. 2011;303(1):47-55. doi:10.1016/j.canlet.2011.01.011

7. Zhang F, Cui J ying, Gao H feng, et al. Cancer-associated fibroblasts induce epithelial-mesenchymal transition and cisplatin resistance in ovarian cancer via CXCL12/CXCR4 axis. *Future Oncol*. 2020;16(32):2619-2633. doi:10.2217/fon-2020-0095

8. Tofani LB, Abriata JP, Luiz MT, Marchetti JM, Swiech K. Establishment and characterization of an in vitro 3D ovarian cancer model for drug screening assays. *Biotechnology Progress*. 2020;36(6):e3034. doi:10.1002/btpr.3034

9. Tofani LB, Sousa LO, Luiz MT, et al. Generation of a Three-Dimensional in Vitro Ovarian Cancer Co-Culture Model for Drug Screening Assays. *JPharmSci*. 2021;110(7):2629-2636. doi:10.1016/j.xphs.2021.04.003

10. Ferjaoui Z, Jamal Al Dine E, Kulmukhamedova A, et al. Doxorubicin-Loaded Thermoresponsive Superparamagnetic Nanocarriers for Controlled Drug Delivery and Magnetic Hyperthermia Applications. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2019;11(34):30610-30620. doi:10.1021/acsami.9b10444

11. Yakavets I, Jenard S, Francois A, et al. Stroma-Rich Co-Culture Multicellular Tumor Spheroids as a Tool for Photoactive Drugs Screening. *JCM*. 2019;8(10):1686. doi:10.3390/jcm8101686

12. Emami Nejad A, Najafgholian S, Rostami A, et al. The role of hypoxia in the tumor microenvironment and development of cancer stem cell: a novel approach to developing treatment. *Cancer Cell International*. 2021;21(1):62. doi:10.1186/s12935-020-01719-5

13. Chastagnier L, el-Kholti N, Essayan L, et al. Deciphering dermal fibroblast behavior in 3D bioprinted dermis constructs. *Bioprinting*. 2023;32:e00275. doi:10.1016/j.bprint.2023.e00275

14. Anderson NM, Simon MC. The tumor microenvironment. *Curr Biol*. 2020;30(16):R921-R925. doi:10.1016/j.cub.2020.06.081

15. Kim J, Park EY, Kim O, et al. Cell Origins of High-Grade Serous Ovarian Cancer. *Cancers (Basel)*. 2018;10(11):433. doi:10.3390/cancers10110433

16. Wang X, Zhang X, Dai X, et al. Tumor-like lung cancer model based on 3D bioprinting. *3 Biotech*. 2018;8(12):501. doi:10.1007/s13205-018-1519-1

17. Bojin F, Robu A, Bejenariu MI, et al. 3D Bioprinting of Model Tissues That Mimic the Tumor Microenvironment. *Micromachines*. 2021;12(5):535. doi:10.3390/mi12050535

18. Zhao Y, Yao R, Ouyang L, et al. Three-dimensional printing of Hela cells for cervical tumor model. *Biofabrication*. 2014;6(3):035001. doi:10.1088/1758-5082/6/3/035001

19. Karagiannis GS, Poutahidis T, Erdman SE, Kirsch R, Riddell RH, Diamandis EP. Cancer-Associated Fibroblasts Drive the Progression of Metastasis through both Paracrine and Mechanical Pressure on Cancer Tissue. *Mol Cancer Res*. 2012;10(11):1403-1418. doi:10.1158/1541-7786.MCR-12-0307

20. Neumann CCM, von Hörschelmann E, Reutzel-Selke A, et al. Tumor–stromal cross-talk modulating the therapeutic response in pancreatic cancer. *HBPD INT*. 2018;17(5):461-472. doi:10.1016/j.hbpd.2018.09.004

21. Liliac L, Carcangiu ML, Canevari S. The value of PAX8 and WT1 molecules in ovarian cancer diagnosis. *Rom J Morphol Embryol*. 2013;54(1):17-27.

22. Yi BR, Kim TH, Kim YS, Choi KC. Alteration of epithelial-mesenchymal transition markers in human normal ovaries and neoplastic ovarian cancers. *Int J Oncol*. 2015;46(1):272-280. doi:10.3892/ijo.2014.2695

23. Nurmik M, Ullmann P, Rodriguez F, Haan S, Letellier E. In search of definitions: Cancer-associated fibroblasts and their markers. *Int J Cancer*. 2020;146(4):895-905. doi:10.1002/ijc.32193

24. Bamberger ES, Perrett CW. Angiogenesis in epithelian ovarian cancer. *Mol Pathol*. 2002;55(6):348-359.

25. Mitra AK. *Ovarian Cancer Metastasis: A Unique Mechanism of Dissemination*. IntechOpen; 2016. doi:10.5772/64700

Chapitre 4 : Comportement du modèle tumoral bio-imprimé vis-à-vis d'un médicament anticancéreux : le cisplatine

Introduction

Consciente des limites associées à la culture cellulaire en 2D, la communauté scientifique déploie des efforts considérables pour développer des modèles *in vitro* alternatifs en cancérologie. La culture cellulaire en 3D semble être une technologie prometteuse dans ce sens[1]. Comparée à la 2D, la configuration tridimensionnelle permet aux cellules de mieux interagir entre elles et avec les éléments de l'ECM[1,2]. Ceci rend les modèles 3D mieux à même de simuler les structures tumorales (elles-mêmes de configuration tridimensionnelle). Logiquement, on pourrait alors s'attendre à ce que ces modèles 3D soient plus prédictifs des réponses aux médicaments observées *in vivo* par rapport à la 2D. Actuellement, les chercheurs s'emploient justement à vérifier cette présomption. Ainsi, beaucoup de travaux sont menés afin de démontrer la pertinence et la plus-value des outils précliniques basés sur la culture cellulaire en 3D[3–5]. Rappelons en effet que ces derniers sont d'apparition relativement récente. Il est donc indispensable que leur utilité soit démontrée clairement avant d'envisager leur utilisation à grande échelle en cancérologie.

Dans l'introduction de ce chapitre, nous allons décrire la méthodologie générale utilisée pour étudier la pertinence des modèles tumoraux en 3D. Nous focaliserons notre discours sur le cancer ovarien (objet de ce projet de thèse). Le but étant de dresser un « paysage bibliographique » avant d'évoquer nos résultats dans le cadre de ce 4ème chapitre. Ceci permettra au lecteur de mieux comprendre notre approche expérimentale et de mieux situer notre travail par rapport à l'état de l'art existant.

Nous allons structurer cette introduction en trois grandes parties :

Dans la première partie nous décrirons l'approche scientifique appliquée généralement pour démonter la pertinence et la plus-value des modèles 3D du cancer ovarien ;

Dans la deuxième partie nous illustrerons nos propos à travers l'étude et la discussion de quelques exemples bibliographiques.

Enfin dans la troisième partie, nous expliquerons plus en détail le but de ce 4ème chapitre et les axes de travail qui y ont seront développés.

1. Approches d'étude de la pertinence des modèles 3D du cancer ovarien

Dans le domaine du cancer ovarien, les travaux étudiant le comportement des modèles 3D vis-à-vis d'agents thérapeutiques ne sont pas très nombreux (comparativement à d'autres types cancéreux). Ces travaux ont généralement un double but : (i) caractériser les réponses thérapeutiques de ces modèles 3D et (ii) démontrer leur plus-value entant qu'outils précliniques. Les modèle 3D étudiés diffèrent en fonction des publications. Il s'agit le plus souvent de sphéroïdes[6,7] ou d'organoïdes[8,9]. Plus rarement, il peut s'agir de cellules cancéreuses cultivées sur des matrices 3D[10]. Cependant, quel que soit le modèle 3D étudié, la démarche scientifique appliquée est souvent la même. **Elle repose sur la comparaison des modèles 3D avec d'autres outils précliniques**. Plusieurs approches comparatives sont possibles :

- ✓ Comparaison des modèles 3D avec des données cliniques de patients : C'est notamment souvent le cas pour les études impliquant des organoïdes[8] ;
- ✓ Comparaison des modèles 3D avec des modèles *in vivo* (Ex. tumeurs générées chez des souris immunodéficientes)[11] ;
- ✓ Comparaison des modèles 3D avec des modèles *ex vivo* (Ex. tissus tumoraux recueillis sur des animaux)[11] ;
- ✓ Comparaison des modèles 3D avec des culture cellulaire en 2D[12].

Dans ces études, les chercheurs utilisent généralement des molécules médicamenteuses connues et communes en thérapie humaine. Le but étant d'avoir des données bibliographiques suffisantes pour discuter les résultats obtenus. Ainsi, ce sont **les sels de platine** et **les taxanes** qu'on retrouve le plus souvent dans les travaux impliquant des modèles tumoraux ovariens. Il s'agit en effet des deux familles de molécules les plus utilisées pour traiter le cancer de l'ovaire (cf. Chapitre 1 : Traitement du HGSC).

Par ailleurs et pour avoir des conclusions solides, les chercheurs combinent généralement plusieurs techniques expérimentales. Autrement dit, ils exécutent plusieurs caractérisations

différentes. Pour chacune de ces caractérisations, les résultats des modèles 3D sont confrontés à ceux des « modèles de comparaison » sélectionnés.

Les caractérisations les plus souvent effectuées peuvent être résumées de la manière suivante :

1.1. L'évaluation de la viabilité cellulaire

C'est l'étude de base qu'on fait pour évaluer l'action d'un agent thérapeutique sur différents modèles. L'approche la plus commune consiste à exposer les modèles étudiés à plusieurs concentrations de médicaments et à dresser la courbe (dose – réponse) correspondante. On détermine ensuite une concentration inhibitrice 50 (IC_{50}). Ce paramètre permet alors de comparer les réponses des différents groupes d'échantillons. D'un point de vue technique, il existe plusieurs méthodes permettant l'évaluation de la viabilité cellulaire. On peut notamment citer le marquage à la calcéine-AM et à l'iodure de propidium. Les techniques de mesure de l'activité métabolique sont aussi très souvent utilisées car elles permettent de réaliser des tests à haut débit. Elles exploitent la conversion enzymatique de divers réactifs comme les sels de tértrazolium ou la résazurine.

1.2. Les études histologiques

Elles sont effectuées notamment dans le cas des organoïdes. On peut ainsi mettre en évidence leurs similitudes morphologiques avec le tissu tumoral *in vivo*. Très souvent, c'est la coloration (hématoxyline – éosine) ou H&E qui est utilisée.

1.3. Les marquages immunologiques

Pour caractériser l'action d'un médicament anticancéreux sur les modèles tumoraux, plusieurs marqueurs immunologiques peuvent être évalués. Ceux qui reviennent le plus souvent dans la littérature sont le marqueur de prolifération Ki-67 et les marqueurs de l'apoptose (notamment la caspase 3 clivée)[11]. Des marqueurs plus spécifiques sont également évalués en fonction des types cellulaires impliqués dans le modèle étudié.

1.4. Les caractérisations génétiques

Quand on compare différents modèles traités avec des médicaments anticancéreux, on peut ne pas observer de différences phénotypiques. Cependant sur le plan moléculaire, les réponses de ces modèles peuvent être différentes. Les études de génomique sont dès lors très utiles pour mettre en évidence ces différences moléculaires. Par exemple en 2021, Tofani *et al.*[7] ont exposé au paclitaxel deux groupes de sphéroïdes : (i) Des sphéroïdes contenant

uniquement des cellules cancéreuses ovariennes et (ii) : Des sphéroïdes contenant des cellules cancéreuses en coculture avec des fibroblastes. Les deux types de sphéroïdes n'ont pas montré de différences en termes de sensibilité au paclitaxel. Par contre, les auteurs ont observé, dans le modèle en coculture, une régulation positive de certains gènes liés à la tumorigenèse, à l'angiogenèse et au processus métastatiques[7]. Pour mieux cerner les modèles 3D, les études génétiques sont donc d'une grande importance.

Pour mieux illustrer nos propos, nous allons aborder et discuter quelques exemples bibliographiques. Ce sera l'objet de la deuxième partie de cette introduction.

2. Analyse de quelques exemples bibliographiques

Comme on l'a vu dans la première partie, les études visant à démontrer l'intérêt des modèles 3D sont très souvent des études comparatives. Pour évaluer la pertinence de ces modèles, l'approche la plus « simple » consiste à les comparer à des cultures cellulaires en 2D. En général, on utilise les mêmes lignées cellulaires pour préparer des cultures 2D et 3D. Ces cultures sont ensuite soumises à plusieurs caractérisations et les résultats obtenus sont comparés. L'avantage principal de cette méthode est sa facilité de mise en place. Elle est donc accessible à un grand nombre d'équipes de recherche. En 2020, Patra *et al.*[12] ont étudié la réponse de quatre lignées cancéreuses ovariennes en 2D et en 3D (sphéroïdes) vis-à-vis du carboplatine. Les sphéroïdes soumis au traitement ont été obtenus soit avec des plaques antiadhérentes ou en utilisant des puces microfluidiques en PDMS. Les échantillons (2D et 3D) ont été traités de telle sorte à marquer les cellules apoptotiques et les cellules nécrotiques. Une analyse en cytométrie en flux a ensuite été réalisée pour déterminer le nombre de cellules ayant survécu après traitement au carboplatine. Deux des lignées testées se sont révélées plus sensibles au carboplatine en 3D par rapport à la 2D. Une autre lignée a, au contraire, vu sa résistance augmenter en 3D[12]. On en conclue donc que **le comportement en 3D par rapport à la 2D varie largement en fonction de la lignée cellulaire considérée**. Dans la discussion de leurs résultats, les auteurs de cette publication[12] ont évoqué d'autres travaux où des cellules cancéreuses ovariennes ont été comparées en 2D et en 3D. L'analyse combinée de l'ensemble de ces articles permet de dégager une certaine tendance. **Il semble en effet que la majorité des cellules étudiées voient leur résistance aux médicaments anticancéreux augmenter en 3D par rapport à la 2D**[12]. Il existe cependant un bon nombre d'exceptions. Autrement dit, il ne s'agit là que d'une « tendance » et non d'une règle générale.

A partir de ce que nous venons de dire, deux autres conclusions semblent se dégager :

- ✓ Pour chaque nouveau modèle 3D utilisant une lignée cellulaire, la comparaison à la 2D est très utile. Elle constitue la première étape pour investiguer le comportement de ce modèle 3D vis-à-vis des médicaments ;
- ✓ **La comparaison 3D *versus* 2D est utile mais n'est absolument pas suffisante pour démontrer la pertinence d'un modèle 3D**. Elle doit être complétée par des investigations supplémentaires.

Pour une meilleure appréciation de la plus-value des modèles 3D, il est en effet nécessaire de les confronter à d'autres outils précliniques (en dehors de la 2D). C'est dans cette perspective qu'une étude a été publiée en 2021 par Brodeur *et al*[11]. Il s'agit d'ailleurs de la même équipe de recherche à l'origine de la publication évoquée plus haut[12]. Dans ce nouveau travail[11], les auteurs ont préparé plusieurs modèles : (i) des cultures cellulaires en 2D ; (ii) des sphéroïdes et (iii) des tissus tumoraux (modèle *ex vivo*). Les réponses de ces modèles au carboplatine ont ensuite été comparées à celles observées sur un modèle *in vivo* (tumeurs générées chez des souris immunodéficientes). Les mêmes lignées cellulaires ont été utilisées pour préparer tous les modèles étudiés. La stratégie de cette étude est illustrée par la Figure 4.44.

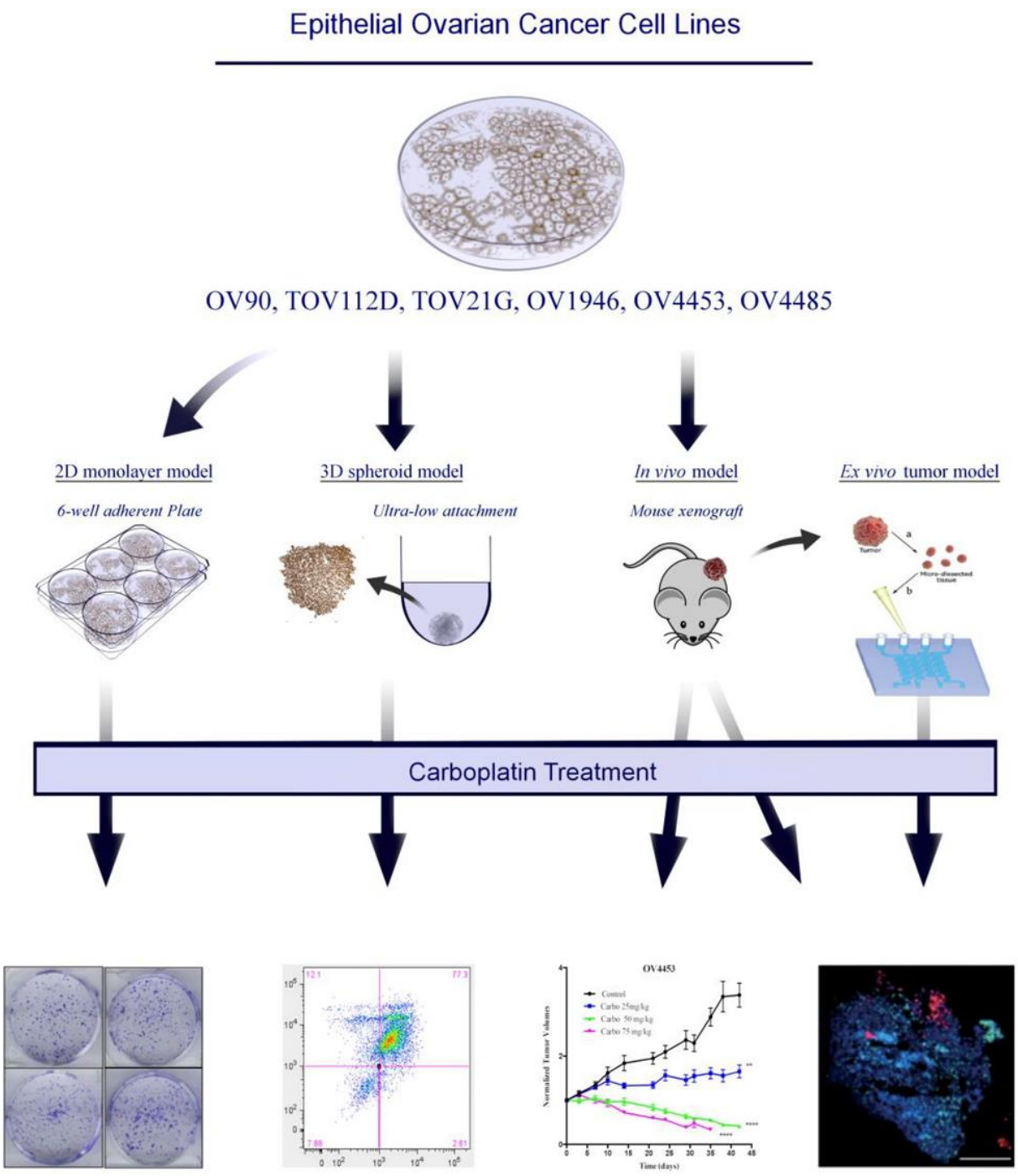


Figure 4.44. Stratégie de l'étude menée par Brodeur *et al*.[11] en 2021. Six lignées cellulaires ont été utilisées pour créer plusieurs modèles. Ceux-ci ont été soumis au traitement par carboplatine. La réponse de chaque modèle a ensuite été quantifiée[11].

Comme on peut le voir sur la Figure 4.44, des caractérisations différentes ont été effectuées sur chaque modèle pour mesurer sa réponse au carboplatine :

- ✓ Sur les cultures 2D : les auteurs ont mesuré la capacité des cellules à former des clusters après traitement (Test de survie clonogénique) ;

- ✓ Sur les sphéroïdes 3D : la réponse au carboplatine a été analysée par cytométrie en flux après marquage différent des cellules mortes et vivantes ;
- ✓ Sur les tissus tumoraux (modèle *ex vivo*) : la réponse au carboplatine a été évaluée par immunofluorescence (marquage anti-Ki-67). Les images ont été traitées de telle sorte à avoir un pourcentage de cellules positives au Ki-67 (cellules prolifératives) ;
- ✓ Sur les tumeurs *in vivo* : la réponse au carboplatine a été mesurée à travers l'évolution du volume des masses tumorales. Des caractérisation histologiques et immunologiques ont également été effectuées sur les tumeurs après leur prélèvement.

Pour chacun des modèles *in vitro* ou *ex vivo* étudiés, les résultats obtenus ont été comparés aux observations faites sur le modèle *in vivo*. Celui-ci a été considéré comme le « modèle de référence » dans cette étude. Ainsi, les auteurs ont calculé **un taux de corrélation** indiquant **la capacité de chaque modèle à prédire la réponse obtenue *in vivo* (sensibilité ou résistance au carboplatine)**. Pour les cultures 2D, ce taux a été de 50% (3 lignées sur les 6 testées). Pour les sphéroïdes (modèle *in vitro* 3D), ce taux de corrélation a été de 66% (4 lignées sur les 6 étudiées).

De part ces résultats, on peut donc conclure que la capacité prédictive des sphéroïdes est supérieure à celle de la culture cellulaire en 2D. Cependant, il faut rester très prudent vis-à-vis de cette conclusion. En effet, cette étude[11] présente un certain nombre de limites méthodologiques qu'il faut prendre en considération. La réponse au carboplatine de chaque modèle a été déterminée avec une approche expérimentale différente. De plus, les seuils de sensibilité ou de résistance ont été fixés différemment pour chaque modèle.

En réalité, les limites de cette étude mettent bien en lumière les difficultés rencontrés lors de la validation des modèles 3D. Comme on l'a dit plus haut, les travaux visant à démontrer l'intérêt de ces modèles font généralement appel à des approches comparatives. Or, ces comparaisons peuvent être biaisées par un grand nombre de paramètres. Notons en particulier que certaines approches expérimentales applicables à la 2D ne s'appliquent pas de la même façon pour la 3D. Il semble donc opportun de définir des protocoles communs à l'échelle internationale pour mener les études de validation des modèles 3D.

En attendant et à travers notre analyse des deux exemples, nous pouvons insister sur les quelques points suivants :

- ✓ Les modèles 3D n'obéissent pas à une règle générale. Chaque modèle se comporte différemment en fonction **des cellules** qui le constituent et **de la technologie** utilisée pour sa préparation ;
- ✓ La comparaison (3D *versus* 2D), même si largement insuffisante, peut être un moyen facile et accessible pour « commencer à comprendre » les modèles 3D ;
- ✓ La comparaison (3D *versus* modèles *in vivo*) semble être un bon moyen pour évaluer la prédictivité des modèles 3D. Cependant, de telles comparions peuvent être soumises à différents biais et limites expérimentales.

Après avoir décrit brièvement l'état de l'art existant en matière de validation des modèles 3D du cancer ovarien, nous allons maintenant évoquer l'objectif de ce 4ème chapitre de thèse.

3. Objectifs du 4ème chapitre de thèse

Dans notre projet de thèse, c'est la bio-impression par extrusion qui a été utilisée pour créer un modèle 3D d'une tumeur ovarienne. A ce jour et au mieux de notre connaissance, il n'existe pas d'autres modèles du cancer ovarien faisant appel à cette technologie. De ce fait, il n'existe pas de données bibliographiques décrivant le comportement des tumeurs ovariennes bio-imprimées en 3D vis-à-vis des molécules thérapeutiques. Or, il est justement crucial d'étudier les réponses de ces modèles bio-imprimés aux médicaments utilisés habituellement pour traiter le cancer ovarien. C'est une étape cruciale avant de pouvoir démontrer la plus-value de ces modèles et d'envisager leur utilisation pour développer de nouveaux médicaments.

Dans ce 4ème chapitre de thèse, nous avons souhaité répondre à ce besoin bibliographique. Notre but était **d'étudier les réponses de notre modèle tumoral bio-imprimé à un agent thérapeutique commun dans le traitement du cancer ovarien : le cisplatine**[13,14].

Bien entendu, notre but n'était pas de démontrer de manière incontestable la plus-value ou la pertinence de notre modèle. Cela aurait été irraisonnablement ambitieux de se fixer un tel objectif. En effet, ni le temps ni les moyens à notre disposition n'auraient permis de mener une étude suffisamment solide pour l'atteindre.

Dans ce 4ème chapitre, il s'agissait donc surtout d'apporter les premiers éléments pour « commencer à comprendre » le comportement des tumeurs ovariennes bio-imprimées en 3D vis-à-vis du cisplatine.

Pour atteindre cet objectif, nous avons choisi d'effectuer une étude basée sur des comparaisons (3D *versus* 2D). Comme nous l'avons dit plus haut, ce type de comparaisons constitue une approche utile pour débuter l'investigation d'un nouveau modèle 3D. Cette option était également la plus pertinente au regard des moyens et des savoir-faire disponibles au sein de l'Institut Jean Lamour.

Nous avons par ailleurs structuré cette étude autour de trois axes principaux :

- ✓ Etude de **l'influence de la bio-impression 3D** sur les réponses au cisplatine de chacun des deux types cellulaires composant notre modèle (SKOV-3 et MeWo). Autrement dit, il s'agissait d'étudier, pour chaque type cellulaire, sa réponse au sein des structures bio-imprimées par rapport à la 2D ;
- ✓ Etude **de la combinaison des deux types cellulaires**. Plus précisément, il s'agissait d'étudier le comportement des cocultures par rapport aux monocultures en 2D et en 3D ;
- ✓ Etude de **l'influence du temps sur les réponses cellulaires**. Autrement dit, il s'agissant de déterminer si le temps de mise en culture des modèles avait (ou pas) une influence sur leur réponse au cisplatine.

Pour apporter des éléments de réponse à ces problématiques, nous avons mis en place un ensemble d'expériences. Celles-ci étaient toutes basées sur l'évaluation de la viabilité cellulaire par le test WST-1 après exposition au cisplatine dans différentes conditions. La méthodologie ayant été appliquée est détaillée dans la 2ème partie du chapitre 2. Ici, nous allons décrire et discuter les résultats obtenus. Nous évoquerons ensuite les limites de cette étude et les perspectives de recherche associées avant de conclure ce chapitre.

I. Résultats et discussion

I.1. Effet de la bio-impression 3D sur les réponses cellulaires au cisplatine

Nous avons commencé par évaluer l'effet de la bio-impression 3D sur les réponses au cisplatine des SKOV-3 et des MeWo. Nous avons étudié **séparément** chacun des deux types cellulaires en 2D et en 3D (au sein des structures bio-imprimées).

I.1.1. Pour les SKOV-3

Les réponses au cisplatine des SKOV-3 en 2D et en 3D sont illustrées par la Figure 4.45.

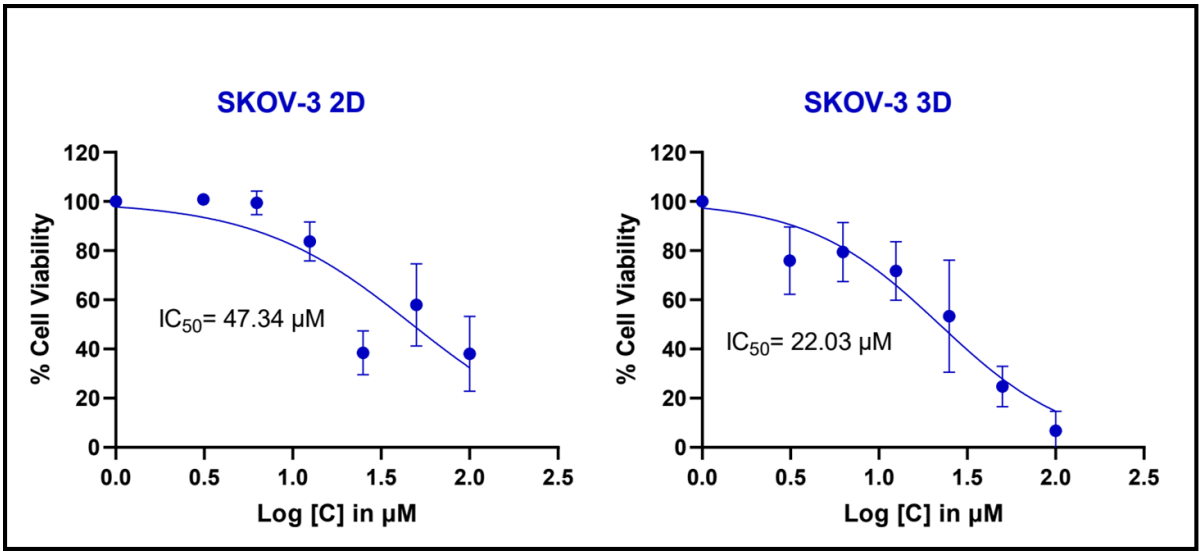


Figure 4.45. Réponse au cisplatine des SKOV-3 en 2D et en 3D. La condition 2D correspond à des cellules cultivées dans des plaques 96 puits (10^4 cellules / puits). La condition 3D correspond à des structures bio-imprimées (10^6 cellules / mL de bio-encre). Trois expériences indépendantes ont été réalisées.

Comme on peut le voir sur la Figure 4.45, L'effet cytotoxique du cisplatine est concentration-dépendant. Ceci est vrai aussi bien en 2D qu'en 3D.

L'IC_{50} en 2D a été évaluée à 47,34 µM. Il s'agit d'une valeur relativement élevée si on la compare à celle déterminée pour les MeWo en 2D (6,98 µM) (Figure 4.46). Ce résultat était attendu. Il faut savoir en effet que la lignée cancéreuse ovarienne SKOV-3 est connue pour être naturellement **résistante au cisplatine**[15,16]. Cette résistance se reflète dans les valeurs de IC_{50} rapportées dans la littérature. Ainsi, Bahar *et al*.[17] ont évalué l'IC_{50} du cisplatine vis-à-vis des SKOV-3 à 63,70 µM après 24 heures d'exposition. A Titre de comparaison, l'IC_{50} de ce même médicament vis-à-vis de la lignée A2780 (lignée ovarienne cancéreuse sensible au cisplatine) a été évaluée à 1,40 µM[18]. La valeur de IC_{50} que nous avons déterminée en 2D semble donc refléter le caractère « cisplatine-résistant » des SKOV-3.

On note cependant que l**a résistance au cisplatine des SKOV-3 diminue en 3D (au sein des structures bio-imprimées) comparativement à la 2D**. On observe en effet une diminution de l'IC_{50} qui passe de 47,34 µM en 2D à 22,03 µM en 3D. A notre connaissance, il n'existe pas encore de travaux étudiant l'effet de la bio-impression 3D sur la résistance au cisplatine des SKOV-3. Aussi, nous n'avons pas de données bibliographiques auxquelles confronter ce

résultat. Cependant, nous pouvons quand même évoquer les réponses des SKOV-3 au cisplatine a**u sein d'autres types de cultures cellulaires en 3D**. Heredia-Soto *et al.*[19] ont utilisé des SKOV-3 pour générer **des sphéroïdes** en utilisant des plaques antiadhérentes. Ces sphéroïdes ont ensuite été utilisés pour évaluer la réponse au cisplatine. Les auteurs ont constaté **une augmentation de la résistance au cisplatine des SKOV-3 au sein de ces sphéroïdes comparativement à la culture cellulaire en 2D**[19]. Cette observation a été corroborée par une autre étude publiée par Gupta *et al*.[10] en 2022. Les auteurs y ont étudié les réponses au cisplatine de divers modèles *in vitro* du cancer ovarien y compris des sphéroïdes de SKOV-3 générés sur des plaques antiadhérentes. Ces sphéroïdes se sont révélés résistants à une concentration de 50 µM de cisplatine. Cette étude ne donne pas de résultats pour les SKOV-3 en 2D. Cependant, elle souligne quand même la capacité des sphéroïdes de SKOV-3 à résister à des concentrations relativement élevées de cisplatine[10].

La résistance au cisplatine des SKOV-3 est donc maintenue (voire potentialisée) dans les sphéroïdes qui sont le modèle 3D le plus utilisé actuellement pour le cancer ovarien. **Les observations faites sur des sphéroïdes sont donc en opposition avec nos résultats obtenus sur les structures bio-imprimées** (où les SKOV-3 deviennent moins résistantes au cisplatine). Rappelons cependant que, même s'il s'agit de deux techniques de culture cellulaire en 3D, la technologie de la bio-impression et celle des sphéroïdes sont totalement différentes.

L'une des différences majeures entre ces deux techniques réside dans l'utilisation ou pas d'une matrice. Les sphéroïdes mentionnés plus haut dans cette discussion (Réfs.[10,19]) ont été générés sans utiliser de matrice. A l'inverse, nous utilisons une matrice (hydrogel gélatine – alginate) pour générer nos structures bio-imprimées. On peut alors évoquer l'impact de cette matrice sur la réponse des SKOV-3 au cisplatine. Lorsqu'elles sont mises en culture 3D via des approches « scaffold-based », les SKOV-3 semblent en effet répondre différemment au cisplatine en fonction de la matrice utilisée[10]. Nous pouvons donc envisager l'hypothèse suivante : La matrice gélatine – alginate contribue, d'une certaine façon, à réduire la résistance des SKOV-3 au cisplatine au sein de nos structures bio-imprimées.

A ce niveau de la discussion le lecteur va probablement se poser la question suivante : la culture 2D, les sphéroïdes et les tumeurs bio-imprimées donnent des réponses différentes avec le même type de cellules (SKOV-3) et pour le même médicament (cisplatine). Quel est

alors le « meilleur modèle » ? ou du moins, quel est le modèle le plus pertinent comme outil préclinique ?

Les données générées dans le cadre de cette étude ne nous permettent pas de répondre clairement à cette question. Des investigations supplémentaires devront être faites afin de mieux caractériser le comportement des cellules à l'échelle moléculaire (génomique, métabolomique ; protéomique etc.) dans chacun de ces modèles. Ceci permettra de mieux comprendre l'impact des conditions de culture sur le comportement des SKOV-3. Nous y reviendrons plus en détail lorsque nous évoquerons les perspectives de cette étude.

I.1.2. Pour les MeWol

Les réponses au cisplatine des MeWo en 2D et en 3D sont illustrées par la Figure 4.46.

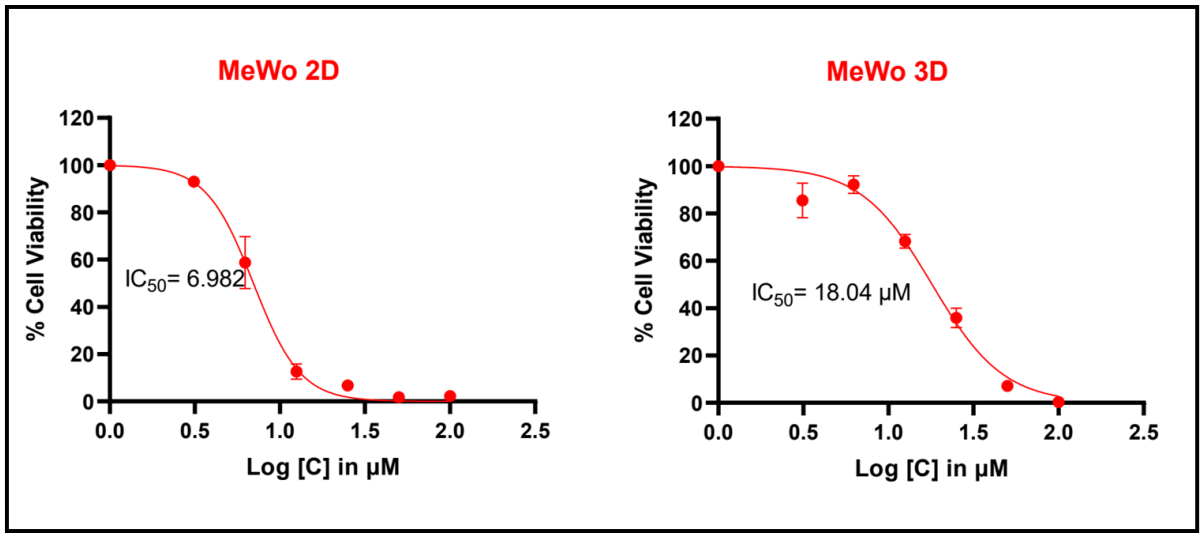


Figure 4.46. Réponse au cisplatine des MeWo en 2D et en 3D. La condition 2D correspond à des cellules cultivées dans des plaques 96 puits (10^4 cellules / puits). La condition 3D correspond à des structures bio-imprimées (10^6 cellules / mL de bio-encre). Trois expériences indépendantes ont été réalisées.

Là encore, la première observation à faire est que l'effet cytotoxique du cisplatine est concentration-dépendant. L'IC_{50} de ce médicament vis-à-vis des MeWo en 2D a été évaluée à 6,98 µM. Une valeur de 9,3 µM a été rapportée dans la littérature[20]. Notre résultat semble donc s'inscrire dans le même ordre de grandeur que les données existantes.

En 3D (au sein des structures bio-imprimées), l'IC_{50} du cisplatine vis-à-vis des MeWo a été évaluée à 18,04 µM. **Ces cellules deviennent donc plus résistantes qu'en 2D** (contrairement au SKOV-3 qui, elles, deviennent plus sensibles au sein des structures bio-imprimées).

On en conclue alors que l'évolution de la réponse au cisplatine (en 3D par rapport à la 2D) dépend du type cellulaire considéré. Nous n'avons pas identifié de données bibliographiques relatives spécifiquement aux réponses des MeWo au cisplatine en 2D et en 3D pour les confronter à nos résultats. Cependant, nous pouvons évoquer les observations faites sur d'autres types cellulaires au sein de structures bio-imprimées. Par exemple, Hermida *et al.*[21] ont décrit un modèle de glioblastome bio-imprimé en 3D dans une matrice à base d'alginate. Ils ont ensuite étudié la réponse au cisplatine de deux types cellulaires (U87MG et G7) en 2D et en 3D (au sein de leur modèle). Les deux types cellulaires se sont avérés plus résistants en 3D mais à des degrés différents (IC_{50} passant de 8,94 µM à 69,8 µM pour les U87MG et de 10,0 µM à 241 µM pour les G7)[21].

Ceci illustre effectivement que certaines cellules deviennent plus résistantes au cisplatine au sein des structures bio-imprimés. Le niveau de résistance acquise en 3D est par ailleurs variable en fonction du type cellulaire considéré.

I.2. Effet de la combinaison des deux types cellulaires

Après avoir visualisé les réponses au cisplatine des SKOV-3 et des MeWo pris séparément (en 2D et en 3D), nous nous sommes intéressés au comportement de la coculture. Pour simuler l'hétérogénéité cellulaire inhérente aux cancers observés *in vivo*, les modèles tumoraux précliniques doivent inclure plusieurs types cellulaires. Il est alors important de comprendre comment la combinaison de ces cellules influence la réponse aux agents thérapeutiques. C'est dans cet esprit que nous avons décidé de conduire cette expérience. Le comportement de la coculture (SKOV-3 + MeWo ; ratio 1 : 1) vis-à-vis du cisplatine a été étudié en 2D et en 3D.

I.2.1. Impact de la coculture en 2D

Les résultats obtenus en 2D sont illustrés par la Figure 4.47 ci-dessous.

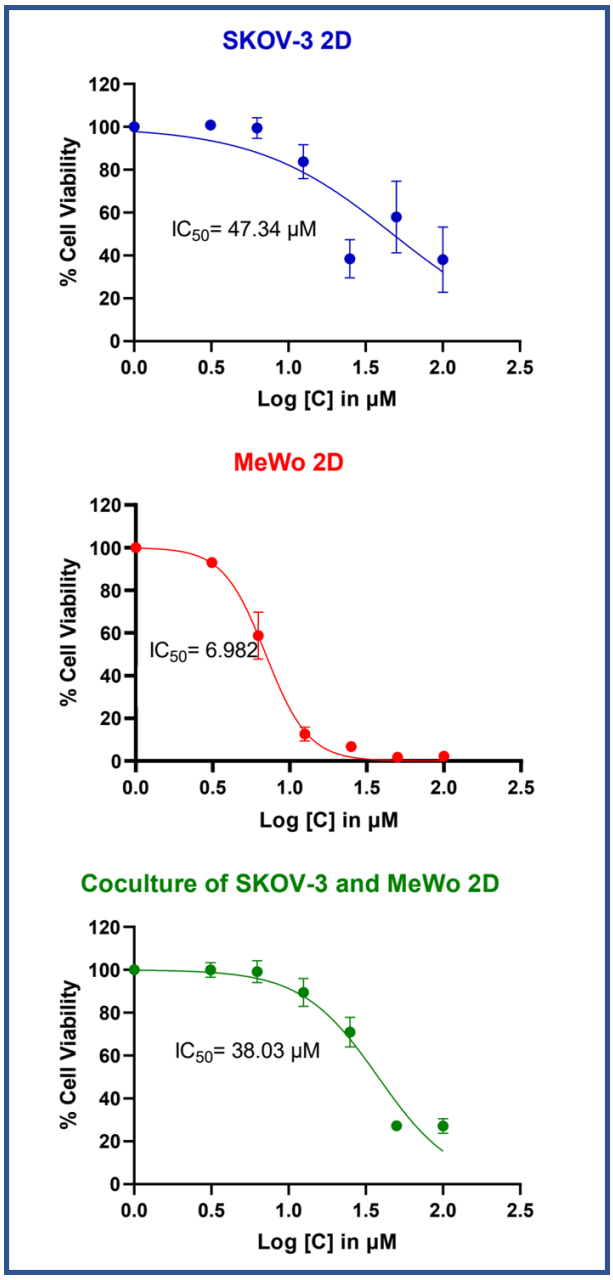


Figure 4.47. Réponse au cisplatine de la coculture (SKOV-3 + MeWo ; ratio de 1 : 1) en comparaison avec les réponses individuelles des deux types cellulaires en 2D. Les cellules ont été ensemencées à 10^4 cellules / puits dans des plaques 96 puits. Trois expériences indépendantes ont été réalisées pour chaque condition.

Comme on peut le voir sur la Figure 4.47, L'IC_{50} de la coculture est **légèrement inférieure** à celle des SKOV-3 seules (38,03 µM pour la coculture contre 47,34 µM pour les SKOV-3 seules). Cela veut dire que la population composée de 50% de SKOV-3 et de 50% de MeWo est **légèrement moins résistante** au cisplatine que les SKOV-3 prisses séparément.

Si on adopte un raisonnement « mathématique », cette observation s'avère compréhensible. Dans la coculture, la moitié de la population est constituée de cellules résistantes (SKOV-3 ;

IC_{50} en monoculture = 47,34 µM) et l'autre moitié est constituée de cellules beaucoup plus sensibles (MeWo ; IC_{50} en monoculture = 6,98 µM). Il est donc logique que la résistance globale de cette population soit inférieure à celle des SKOV-3 seules.

I.2.2. Impact de la coculture en 3D

Les résultats obtenus par rapport à l'impact de la coculture en 3D sont illustrés par la Figure 4.48 ci-dessous.

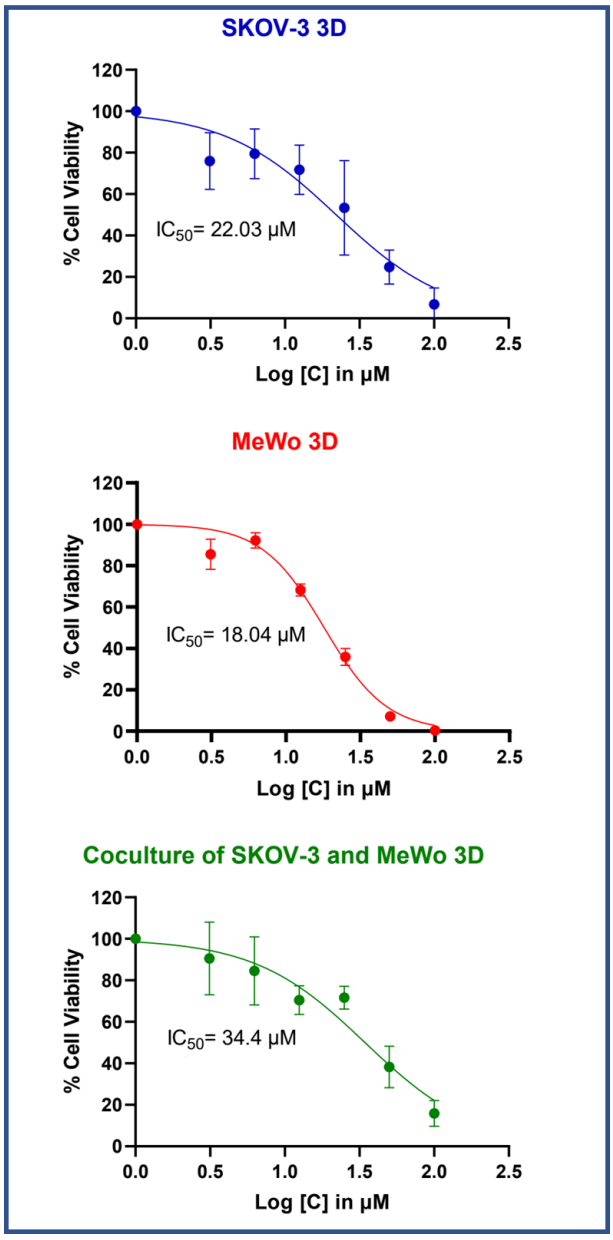


Figure 4.48. Réponse au cisplatine de la coculture (SKOV-3 + MeWo ; ratio de 1 : 1) en comparaison avec les réponses individuelles des deux types cellulaires en 3D (Au sein de structures bio-imprimées). Ces structures ont été préparées avec une des bio-encres contenant 10^6 cellules / mL (soit 100% de SKOV-3 ou 100% de MeWo ou 50% de SKOV-3 + 50% de MeWo). Trois expériences indépendantes ont été réalisées pour chaque condition.

Comme on peut le voir sur la Figure 4.48 ci-dessus, **la coculture en 3D s'avère plus résistante au cisplatine que les deux types cellulaires pris séparément**. L'IC_{50} du cisplatine vis-à-vis de la coculture a été évaluée à 34,4 µM alors qu'elle a été de 22,03 µM pour les SKOV-3 et de 18,04 µM pour les MeWo.

Ici le raisonnement « mathématique » que nous avions évoqué plus haut pour la 2D ne fonctionne donc plus. Logiquement, on se serait attendu à avoir, en coculture 3D, un niveau de résistance intermédiaire entre celui des SKOV-3 et celui des MeWo (soit une IC_{50} en coculture comprise entre 18 et 22 µM). Or on se rend compte que la valeur expérimentale obtenue en coculture est de l'ordre de 34 µM. L'hypothèse la plus plausible pour expliquer cette observation est que **les MeWo (fibroblastes cancéreux ou CAFs) potentialiseraient la résistance au cisplatine des SKOV-3 au sein des structures bio-imprimées**. Les tumeurs bio-imprimées contenant les deux types cellulaires deviendraient alors plus résistantes que celles contenant uniquement des SKOV-3.

Cette hypothèse est corroborée par des données bibliographiques. Les CAFs sont en effet décrits comme étant des acteurs clés de la chimiorésistance du cancer ovarien *in vivo*[22]. Ils agissent notamment en inhibant l'apoptose des cellules cancéreuses et en amplifiant leur caractère souche[22]. Des études épidémiologiques pointent également le rôle des CAFs dans la chimiorésistance et donc dans le pronostic global des patientes atteintes de cancers ovariens. Ainsi, Wessolly *et al*.[23] ont étudié une cohorte de patientes atteintes de HGSC. Ils ont constaté une corrélation entre l'expression de gènes associés à l'activité des CAFs et la détérioration du pronostic des patientes suite à un échec thérapeutique[23].

Par ailleurs, il est intéressant de noter que nous avons observé ce phénomène de potentialisation de la résistance au cisplatine **en coculture 3D mais pas en coculture 2D**. En 2D, nous avons obtenu une IC_{50} de 38,03 µM pour la coculture. Soit une valeur i**ntermédiaire** entre celles des SKOV-3 en 2D (47,34 µM) et celle des MeWo en 2D (6,98 µM). En 3D par contre, l'IC_{50} obtenue en coculture (34,4 µM) était **supérieure** à celle obtenue pour les SKOV-3 (22,03 µM) et à celle obtenue pour les MeWo (18,04 µM)**.** On pourrait alors supposer que l'environnement tridimensionnel créé grâce à la bio-impression ait favorisé les interactions des CAFs (MeWo) avec les cellules cancéreuses (SKOV-3) augmentant ainsi la chimiorésistance de ces dernières.

Pour mieux comprendre le rôle de chacun des deux types cellulaires dans la réponse des modèles tumoraux bio-imprimés en 3D, nous avons procédé à une quantification de leurs proportions respectives au sein de ces modèles à J+1 après bio-impression. Pour ce faire, nous avons utilisé les images obtenues par microscopie confocale (cf. Chapitre 3). Le traitement informatique de ces images a révélé que, à J+1 après bio-impression, la proportion des MeWo était nettement supérieure à celle des SKOV-3 (86% pour les MeWo *versus* 14% pour les SKOV-3). Or, d'après les résultats obtenus en monocultures 3D, les MeWo sont justement plus sensibles que les SKOV-3. En coculture 3D, on est donc en présence d'une grande proportion de cellules sensibles (MeWo) et d'une moindre proportion de cellules plus résistantes (SKOV-3). En dépit de cela, la coculture 3D s'est révélé être plus résistante que chacune des monocultures 3D. Cette observation semble constituer un argument supplémentaire en faveur de la présence d'un phénomène de synergie de chimiorésistance au sein de la coculture 3D.

Nous devons néanmoins souligner une autre observation importante. Certes, la coculture 3D est plus résistante que les 2 monocultures 3D. **En revanche, si on compare la coculture 3D à la coculture 2D, on n'observe qu'une très faible différence**. Ceci est illustré par la Figure 4.49.

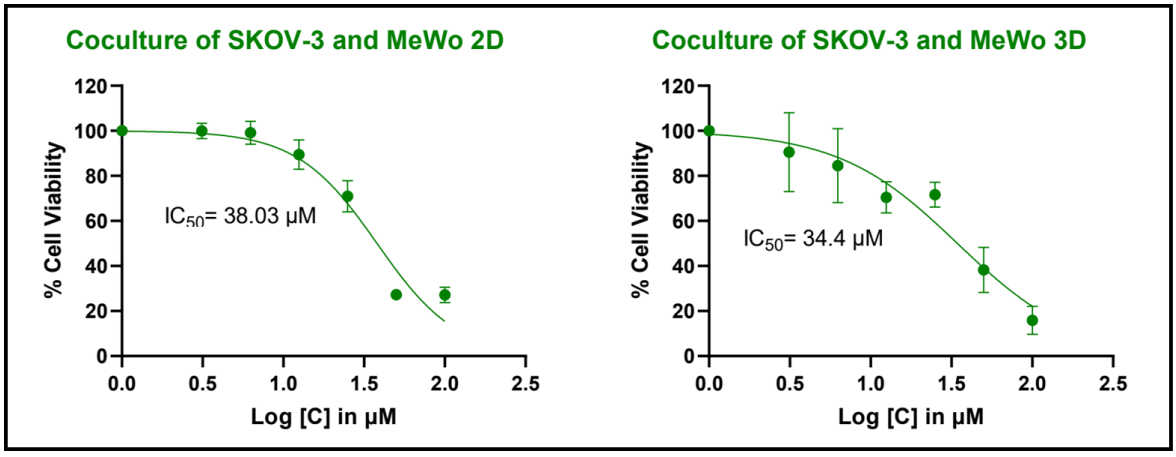


Figure 4.49. Réponse au cisplatine de la coculture 2D en comparaison avec la coculture 3D. Trois expériences indépendantes ont été réalisées.

Comme on peut le voir sur la Figure 4.49, l'IC_{50} du cisplatine vis-à-vis de la coculture 2D a été évaluée à 38,03 µM. Celle en 3D a été évaluée à 34,4 µM. La différence de résistance au cisplatine entre les deux cocultures (2D et 3D) est donc négligeable. Mais alors, on est en droit de se poser la question suivante : pourquoi est-ce que le supposé phénomène de synergie

observé au sein de la coculture 3D ne se reflète pas par une augmentation de sa résistance par rapport à la 2D ?

L'une des réponses possibles est la suivante : Les SKOV-3 sont bien plus résistantes en 2D qu'en 3D (Figure 4.45). Donc, même avec la synergie (SKOV-3 – MeWo) observée au sein de la coculture 3D, cette dernière reste à peu près au même niveau de résistance que la coculture 2D.

Pour résumer, on peut schématiser cette hypothèse de la façon suivante. En 2D, on a des SKOV-3 très résistantes qui ne sont pas « aidées » par les MeWo en coculture. A l'inverse en 3D, on a des SKOV-3 plus sensibles mais qui sont « soutenues » par les MeWo en coculture. Au final, les deux types de coculture (2D et 3D) se retrouvent quasiment au même niveau de résistance au cisplatine. Néanmoins, les mécanismes cellulaires derrière ces niveaux de résistance sont vraisemblablement différents.

I.3. Etude de l'impact du temps sur les réponses au cisplatine

Le cancer est une maladie qui évolue sur le long terme. Les modèles tumoraux précliniques doivent être capables de prendre en compte cette dimension « temporelle » de la pathologie cancéreuse. Il est alors important d'étudier l'évolution du comportement de ces modèles en fonction du temps.

C'est dans cette logique que nous avons mené cette expérience. Nous avons voulu étudier l'impact du temps sur la réponse au cisplatine de nos modèles tumoraux. Pour ce faire, nous avons préparé des structures bio-imprimées contenant 50% de SKOV-3 et 50% de MeWo. Nous les avons ensuite exposées au cisplatine une journée ou cinq jours après leur impression. Nous avons mené la même expérience en 2D avec des cocultures qui ont été exposées au cisplatine une journée ou cinq jours après leur préparation.

Les résultats obtenus en 2D et en 3D sont illustrés par la Figure 4.50.

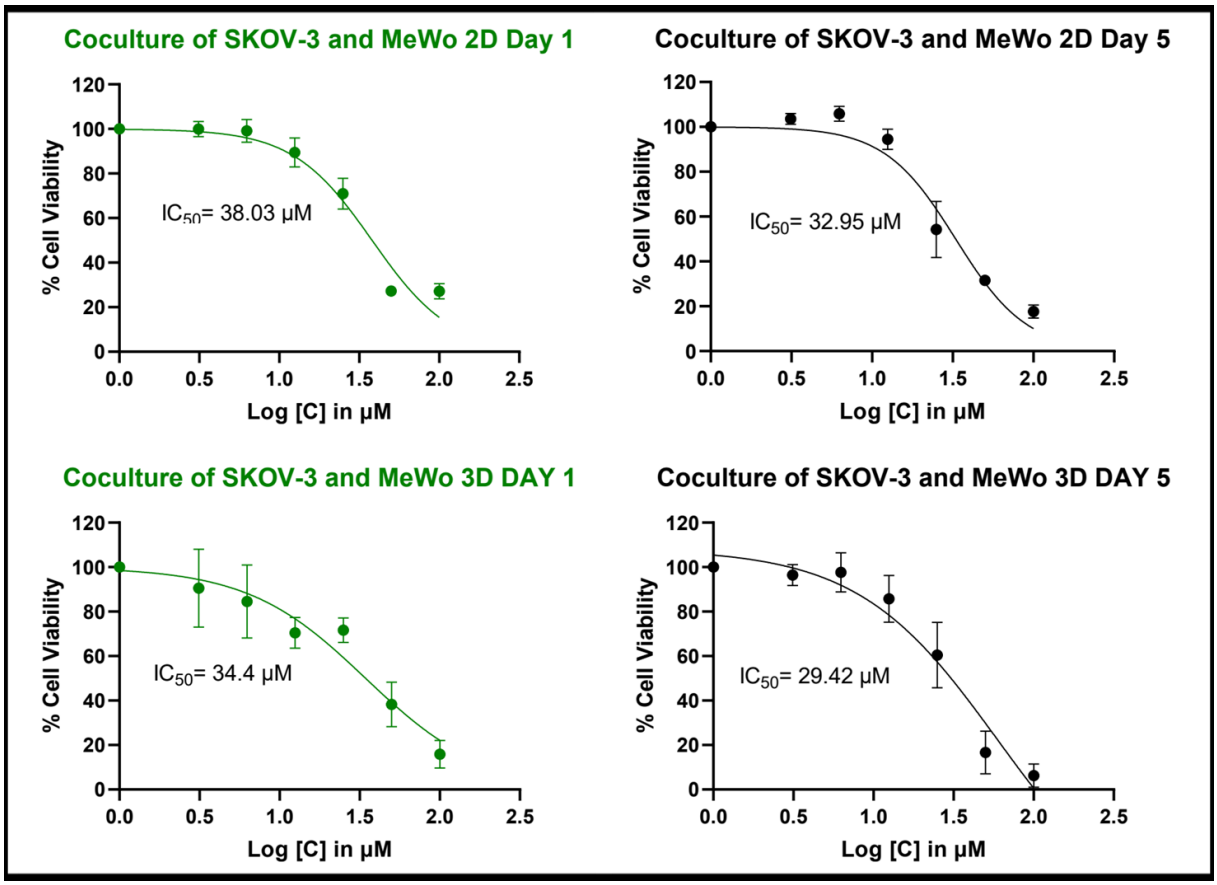


Figure 4.50. Cinétique de la réponse au cisplatine en 2D (en haut) et en 3D (en bas). Les cocultures 2D ou les structures bio-imprimées en 3D ont été exposées au cisplatine une journée ou cinq jours après leur préparation. Trois expériences indépendantes ont été réalisées pour chaque condition.

Comme on peut le voir sur la Figure 4.50, les réponses au cisplatine des cocultures 2D et 3D ne varient pas beaucoup à J+5 comparativement à J+1. En 2D, l'IC_{50} passe de 38,03 µM à J+1 à 32,95 µM à J+5. En 3D, elle passe de 34,4 µM à J+1 à 29,42 µM à J+5. Il y donc une faible tendance à la baisse de la chimiorésistance à J+5 par rapport à J+1 mais cette tendance reste limitée.

La mise en culture pendant 5 jours semble donc avoir peu d'influence sur la réponse au cisplatine des cocultures 2D et 3D. Nous avions fixé cette durée de 5 jours en tenant compte des contraintes techniques associées à nos structures bio-imprimées. Comme nous l'avions expliqué dans le chapitre 3, ces structures deviennent en effet très difficilement manipulables au-delà du 7ème jour de culture (impossibilité de les soumettre à la technique WST-1). D'un autre côté, il faut compter deux jours pour l'exposition au cisplatine et la rémission. C'est pour cela que la durée de mise en culture de 5 jours a été retenue pour cette étude.

Il faut aussi mentionner que les structures bio-imprimées deviennent plus fragiles au fur et à mesure du temps. Ceci serait dû à la dégradation progressive de la matrice par les cellules. La matrice deviendrait, de ce fait, plus perméable au cisplatine. C'est probablement ce qui explique la diminution de la résistance à J+5 par rapport à J+1 après bio-impression.

II. Limites de cette étude et perspectives de recherche associées

Cette étude fournit **les toutes premières données expérimentales** relatives à la réponse au cisplatine de tumeurs ovariennes bio-imprimées en 3D. Nous pensons qu'il est très important de bien cerner le comportement de ces modèles vis-à-vis de médicaments connus avant d'envisager leur utilisation comme outils précliniques. Bien que cette étude ait fourni quelques réponses, elle présente certaines limites qui, nous l'espérons, ouvriront la voie à de nouveaux travaux.

Nous pouvons présenter ces limites de la façon suivante :

- ✓ La première chose à savoir est que cette étude est une étude préliminaire et que les conclusions qui en découlent sont encore à confirmer. Les manipulations décrites dans le cadre de ce chapitre ont été effectuées tout à fait à la fin du temps imparti pour la thèse. Pour étayer les premiers résultats obtenus, il serait souhaitable de refaire des tests de cytotoxicité en appliquant des gammes de concentration plus larges de cisplatine pour chaque condition. En effet, pour déterminer l'IC_{50} de manière fiable et précise, il est d'usage de déterminer, pour chaque condition, les concentrations non toxiques, et celles conduisant à une toxicité de 100%. Aussi, dans l'idéal, l'identification de 3 concentrations conduisant à des toxicités intermédiaires (dans la pente de la courbe dose/réponse) est recommandée. Dans ce travail, nous n'avons pas pu atteindre une mortalité de 100% dans certaines conditions (c'est le cas pour les SKOV-3 en 2D pour 100 µM de cisplatine par exemple) ;
- ✓ Les cellules en 2D et les structures bio-imprimées en 3D ont été exposées au cisplatine selon les mêmes modalités (24 heures d'exposition suivies de 24 heures de rémission). Cependant en 3D, l'hydrogel se charge potentiellement en cisplatine au cours des 24 heures d'exposition. Aussi, l'exposition des cellules en 3D se prolongerait au cours de

la phase de rémission en raison de la présence de cisplatine dans l'hydrogel. Ce phénomène n'a pas été pris en compte dans cette étude en raison des contraintes de temps auxquelles nous avons dû faire face. Néanmoins, il serait intéressant de le prendre en compte à l'avenir pour rendre les comparaisons 2D *versus* 3D plus précises ;

- ✓ Dans cette étude, nous nous sommes restreints à l'évaluation d'un seul paramètre expérimental. A savoir l'évaluation de la viabilité cellulaire par la technique WST-1. Ce choix s'est imposé à nous pour des raisons de temps et de logistique. Il serait très intéressant de compléter ce travail en effectuant d'autres analyses telles que l'évaluation de l'apoptose ou l'évaluation de l'expression de gènes associés à la chimiorésistance par exemple. Ces analyses permettraient de corroborer les observations obtenues et de mieux comprendre le comportement des cellules dans les structures bio-imprimées ;
- ✓ Dans cette étude, nous nous sommes restreints au cisplatine. C'est le chef de file des sels de platine ; des médicaments très utilisés dans la prise en charge thérapeutique du cancer ovarien. Il serait cependant intéressant d'investiguer d'autres médicaments notamment le paclitaxel ou les combinaisons (sels de platine – paclitaxel) ;
- ✓ Dans cette étude, l'exposition des structures bio-imprimées au cisplatine s'est faite dans des conditions « statiques » (dans des plaques 24 puits). Or, ceci ne reflète pas parfaitement la réalité biologique. Dans le corps, les médicaments sont véhiculés par le sang qui circule dans le réseau vasculaire tumoral. Il est important que cet aspect « dynamique » soit pris en compte. C'est d'ailleurs ce dont nous allons parler plus en détail dans le 5ème chapitre de ce manuscrit.

En plus de ces limites, et comme nous l'avons vu dans la discussion, notre étude a aussi généré plusieurs questions qu'il convient de continuer à explorer. Nous pouvons résumer ces questions en quelques points :

- ✓ **Effet des biomatériaux présents dans la bio-encre sur les réponses cellulaires** : Il serait intéressant d'étudier plusieurs bio-encres avec des compositions différentes. Ceci permettrait de mieux caractériser l'influence des matériaux composant la bio-encre sur les réponses cellulaires au sein des structures bio-imprimées ;

- ✓ **Comparaison à d'autres modèles précliniques** : Comme nous l'avons mentionné précédemment, des approches de culture cellulaire 3D différentes peuvent donner des réponses différentes pour un même type cellulaire et un même médicament. Il serait donc intéressant de comparer les modèles bio-imprimés à des technologies différentes (Ex. des sphéroïdes). De plus, les résultats issus de ces différents modèles *in vitro* devraient être confrontés à ceux obtenus avec des « modèles de référence ». Un modèle de référence pourrait être, par exemple, des tumeurs générées *in vivo* avec les mêmes types cellulaires que ceux étudiés *in vitro*. L'idée à travers ces comparaisons serait d'attribuer un « indice de prédictivité » à chaque modèle 3D *in vitro*. En effet, l'étude que nous avons décrit dans ce chapitre ne donne pas une conclusion claire par rapport à la prédictivité de nos tumeurs bio-imprimées. La comparaison avec d'autres techniques *in vitro* et avec des modèles de références *in vivo* semble être le meilleur moyen d'évaluer plus précisément la valeur des tumeurs bio-imprimés comme outils précliniques.

III. Conclusion du 4ème chapitre

La culture cellulaire en 3D commence à être utilisée pour créer des modèles tumoraux ovariens. Cependant, leur plus-value et leur pertinence nécessitent encore d'être pleinement démontrées. Pour y arriver, la première phase consiste à caractériser les réponses de ces modèles vis-à-vis de médicaments connus. Quelques données dans ce sens sont déjà disponibles pour les sphéroïdes et les organoïdes simulant des cancers de l'ovaire. Par contre, il n'existe actuellement aucune donnée concernant les modèles tumoraux ovariens bio-imprimés en 3D. Pour répondre à ce besoin nous avons étudié, dans ce chapitre, les réponses de nos tumeurs ovariennes bio-imprimées en 3D vis-à-vis du cisplatine. Ce médicament a été sélectionné car il occupe une place essentielle dans la prise en charge du cancer ovarien. Dans un premier temps, nous avons étudié l'impact de la bio-impression 3D sur les réponses cellulaires. Celui-ci s'est révélé différent en fonction du type cellulaire considéré. Ainsi, Les SKOV-3 deviennent plus sensibles alors que les MeWo deviennent plus résistantes au cisplatine au sein des structures bio-imprimées. L'association des MeWo (CAFs) aux SKOV-3 semble par ailleurs potentialiser la résistance de ces dernières au cisplatine en 3D mais pas en

2D. Ceci pourrait souligner le rôle de l'environnement tridimensionnel dans les interactions entre les cellules cancéreuses et les cellules stromales. Enfin, une durée de mise en culture de 5 jours ne semble pas modifier profondément la réponse au cisplatine des structures bio-imprimées. Cette étude fournit ainsi des premiers éléments de réponse qui devront encore être complétés par d'autres investigations. Le but à long terme étant de véritablement démontrer l'intérêt de ces tumeurs ovariennes bio-imprimées comme outils précliniques.

Références bibliographiques

1. Habanjar O, Diab-Assaf M, Caldefie-Chezet F, Delort L. 3D Cell Culture Systems: Tumor Application, Advantages, and Disadvantages. *Int J Mol Sci*. 2021;22(22):12200. doi:10.3390/ijms222212200

2. Kapałczyńska M, Kolenda T, Przybyła W, et al. 2D and 3D cell cultures – a comparison of different types of cancer cell cultures. *Arch Med Sci*. 2018;14(4):910-919. doi:10.5114/aoms.2016.63743

3. Guan X, Huang S. Advances in the application of 3D tumor models in precision oncology and drug screening. *Front Bioeng Biotechnol*. 2022;10:1021966. doi:10.3389/fbioe.2022.1021966

4. Xiao RR, Jin L, Xie N, et al. Establishment and large-scale validation of a three-dimensional tumor model on an array chip for anticancer drug evaluation. *Front Pharmacol*. 2022;13:1032975. doi:10.3389/fphar.2022.1032975

5. Liu P, Roberts S, Shoemaker JT, Vukasinovic J, Tomlinson DC, Speirs V. Validation of a 3D perfused cell culture platform as a tool for humanised preclinical drug testing in breast cancer using established cell lines and patient-derived tissues. *PLoS One*. 2023;18(3):e0283044. doi:10.1371/journal.pone.0283044

6. Tofani LB, Abriata JP, Luiz MT, Marchetti JM, Swiech K. Establishment and characterization of an in vitro 3D ovarian cancer model for drug screening assays. *Biotechnology Progress*. 2020;36(6):e3034. doi:10.1002/btpr.3034

7. Tofani LB, Sousa LO, Luiz MT, et al. Generation of a Three-Dimensional in Vitro Ovarian Cancer Co-Culture Model for Drug Screening Assays. *JPharmSci*. 2021;110(7):2629-2636. doi:10.1016/j.xphs.2021.04.003

8. Maenhoudt N, Defraye C, Boretto M, et al. Developing Organoids from Ovarian Cancer as Experimental and Preclinical Models. *Stem Cell Reports*. 2020;14(4):717-729. doi:10.1016/j.stemcr.2020.03.004

9. Chen H, Gotimer K, De Souza C, et al. Short-term organoid culture for drug sensitivity testing of high-grade serous carcinoma. *Gynecol Oncol*. 2020;157(3):783-792. doi:10.1016/j.ygyno.2020.03.026

10. Gupta P, Miller A, Olayanju A, Madhuri TK, Velliou E. A Systematic Comparative Assessment of the Response of Ovarian Cancer Cells to the Chemotherapeutic Cisplatin in 3D Models of Various Structural and Biochemical Configurations—Does One Model Type Fit All? *Cancers (Basel)*. 2022;14(5):1274. doi:10.3390/cancers14051274

11. Brodeur MN, Simeone K, Leclerc-Deslauniers K, et al. Carboplatin response in preclinical models for ovarian cancer: comparison of 2D monolayers, spheroids, ex vivo tumors and in vivo models. *Sci Rep*. 2021;11(1):18183. doi:10.1038/s41598-021-97434-w

12. Patra B, Lateef MA, Brodeur MN, et al. Carboplatin sensitivity in epithelial ovarian cancer cell lines: The impact of model systems. *PLoS One*. 2020;15(12):e0244549. doi:10.1371/journal.pone.0244549

13. S. Lee RF, Riedel T, Escrig S, et al. Differences in cisplatin distribution in sensitive and resistant ovarian cancer cells: a TEM/NanoSIMS study. *Metallomics*. 2017;9(10):1413-1420. doi:10.1039/C7MT00153C

14. Jiang Y, Jiang J, Jia H, Qiao Z, Zhang J. Recovery of miR-139-5p in Ovarian Cancer Reverses Cisplatin Resistance by Targeting C-Jun. *CPB*. 2018;51(1):129-141. doi:10.1159/000495169

15. De Castro F, Benedetti M, Antonaci G, et al. Response of Cisplatin Resistant Skov-3 Cells to [Pt(O,O'-Acac)(γ-Acac)(DMS)] Treatment Revealed by a Metabolomic 1H-NMR Study. *Molecules*. 2018;23(9):2301. doi:10.3390/molecules23092301

16. Hunakova L, Gronesova P, Horvathova E, et al. Modulation of cisplatin sensitivity in human ovarian carcinoma A2780 and SKOV3 cell lines by sulforaphane. *Toxicology Letters*. 2014;230(3):479-486. doi:10.1016/j.toxlet.2014.08.018

17. Bahar E, Kim JY, Kim HS, Yoon H. Establishment of Acquired Cisplatin Resistance in Ovarian Cancer Cell Lines Characterized by Enriched Metastatic Properties with Increased Twist Expression. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(20). doi:10.3390/ijms21207613

18. Sarwar S, Alamro AA, Alghamdi AA, et al. Enhanced Accumulation of Cisplatin in Ovarian Cancer Cells from Combination with Wedelolactone and Resulting Inhibition of Multiple Epigenetic Drivers. *Drug Des Devel Ther*. 2021;15:2211-2227. doi:10.2147/DDDT.S288707

19. Heredia-Soto V, Redondo A, Berjón A, et al. High-throughput 3-dimensional culture of epithelial ovarian cancer cells as preclinical model of disease. *Oncotarget*. 2018;9(31):21893-21903. doi:10.18632/oncotarget.25098

20. Swanepoel B, Nitulescu GM, Olaru OT, Venables L, van de Venter M. Anti-Cancer Activity of a 5-Aminopyrazole Derivative Lead Compound (BC-7) and Potential Synergistic Cytotoxicity with Cisplatin against Human Cervical Cancer Cells. *Int J Mol Sci*. 2019;20(22):5559. doi:10.3390/ijms20225559

21. Hermida MA, Kumar JD, Schwarz D, et al. Three dimensional in vitro models of cancer: Bioprinting multilineage glioblastoma models. *Adv Biol Regul*. 2020;75:100658. doi:10.1016/j.jbior.2019.100658

22. Zhang M, Chen Z, Wang Y, Zhao H, Du Y. The Role of Cancer-Associated Fibroblasts in Ovarian Cancer. *Cancers (Basel)*. 2022;14(11):2637. doi:10.3390/cancers14112637

23. Wessolly M, Mairinger E, Borchert S, et al. CAF-Associated Paracrine Signaling Worsens Outcome and Potentially Contributes to Chemoresistance in Epithelial Ovarian Cancer. *Front Oncol*. 2022;12:798680. doi:10.3389/fonc.2022.798680

Chapitre 5 : Intégration du modèle tumoral bio-imprimé au sein d'un système microfluidique

Introduction

1. Contexte bibliographique

Le microenvironnement tumoral se caractérise par une extrême complexité. Celle-ci est notamment due à la diversité des cellules et des molécules qui le constituent et qui y interagissent. A côté des cellules cancéreuses, on y trouve en effet plusieurs autres types cellulaires (fibroblastes ; cellules endothéliales ; cellules immunitaires etc.). En plus de la diversité de ses acteurs, le tissu tumoral est aussi influencé par **les conditions dynamiques** qui y règnent et qui y jouent un rôle très important[1]. Ces conditions dynamiques sont en partie associées à certains processus physiologiques tels que : (i) la circulation sanguine dans les capillaires[2] ; (ii) les mouvements respiratoires (Ex. Dans le cas du cancer pulmonaire)[3] ou encore (iii) le péristaltisme digestif (Ex. Dans le cas du cancer colorectal)[4]. Par ailleurs, certaines conditions dynamiques découlent de l'évolution même de la pathologie cancéreuse (Ex. Les contraintes mécaniques associées à l'augmentation du volume de la masse tumorale)[5].

Ces conditions dynamiques suscitent de plus en plus d'intérêt ces dernières années. On commence à se rendre compte de leur importance dans la physiopathologie des maladies cancéreuses[6]. L'environnement mécanique d'une tumeur semble influencer un grand nombre de phénomènes clés depuis le développement cancéreux jusqu'aux processus métastatiques en passant par les rechutes post-thérapeutiques[1].

Pour créer des modèles tumoraux *in vitro* fiables et prédictifs, il est donc nécessaire que cet environnement dynamique soit pris en compte. Dans ce cadre, la technologie microfluidique semble être d'un grand intérêt. Elle permet de créer des modèles cancéreux où différentes contraintes mécaniques peuvent être simulées. Ces modèles sont souvent désignés comme étant des cancers sur puce (ou Cancer-on-Chip (CoC) en anglais).

Depuis son apparition, la technologie des CoC a été adaptée à plusieurs types cancéreux. Son application au cancer ovarien reste toutefois limitée même si quelques travaux ont été rapportés. Ceux-ci s'intéressent à divers aspects tels que l'origine des tumeurs ovariennes[7,8] ou leur dissémination métastatique sous conditions dynamiques[9,10]. La microfluidique a également été utilisée pour étudier l'impact des contraintes mécaniques associées à l'ascite sur la physiopathologie du cancer ovarien[11]. Par contre, il existe très peu de modèles de tumeurs ovariennes sur puce destinés à l'évaluation d'agents thérapeutiques. Le lecteur peut se référer au chapitre bibliographique de ce manuscrit pour en apprendre davantage.

Globalement, l'application de la technologie des CoC au cancer ovarien est donc encore balbutiante. En revanche, son progrès est plus important pour d'autres types cancéreux comme le cancer du sein ou le cancer du poumon. Il existe actuellement plusieurs modèles dynamiques de ces cancers basés sur la technologie des CoC[12]. Certains de ces modèles permettent l'évaluation d'agents thérapeutiques en tenant compte de l'environnement biologique et mécanique des tumeurs étudiées[3].

Les modèles actuels de cancers sur puce semblent néanmoins présenter une limite commune. **Ils se restreignent à l'étude des interactions entre l'agent thérapeutique et le tissu cancéreux lui-même ou son environnement immédiat**. Autrement dit, ils ne prennent pas en compte « l'histoire » du médicament avant son interaction avec la tumeur. Plus précisément, les modèles actuels **ne permettent pas de simuler la phase du transport vasculaire du médicament**. Or, cette phase est cruciale car elle est associée à certains phénomènes pharmacocinétiques importants. Dans le sang, les molécules médicamenteuses se fixent notamment aux protéines plasmatiques. Il s'instaure alors un équilibre entre la fraction « libre » et la fraction « liée » du médicament. Ceci conditionne la capacité de ce dernier à diffuser dans les tissus[13]. Ces interactions au cours du transport vasculaire sont d'autant plus importantes dans le cas des **médicaments sous forme nanoparticulaire**. Les nanoparticules médicamenteuses adsorbent en effet les protéines plasmatiques qui forment autour d'elles une « couronne protéique ». Celle-ci affecte largement les propriétés de ces nanomédicaments notamment leur capacité à reconnaitre et à se fixer aux cellules cibles[14,15].

Il est donc très important que cette phase de transport vasculaire soit prise en compte dans la conception des modèles précliniques. Idéalement, **un modèle préclinique devrait**

permettre de simuler en même temps le transport vasculaire du médicament et son interaction avec le tissu cible.

D'un autre côté, il est aussi important **de pouvoir tester simultanément plusieurs concentrations différentes de médicament dans un même modèle**. Ceci permet d'accélérer l'acquisition des résultats expérimentaux tout en réduisant le nombre de manipulations nécessaires et donc le risque d'erreur associé. Ainsi, on peut identifier plus rapidement et plus précisément la marge thérapeutique d'un médicament (intervalle entre la concentration efficace et la concentration toxique).

2. Objectifs du 5ème chapitre de thèse

L'analyse bibliographique décrite ci-dessus nous a permis d'identifier trois axes de travail essentiels :

- ✓ Nécessité de prendre en compte les conditions dynamiques associées à l'environnement tumoral ;
- ✓ Importance de simuler le trajet vasculaire du médicament en plus de son interaction avec le tissu tumoral ;
- ✓ Importance de pouvoir tester plusieurs concentrations différentes de médicament sur un même modèle.

Ce sont ces trois problématiques qui nous ont inspirés pour ce 5ème chapitre de thèse. En effet et comme nous l'avions mentionné à la fin du 4ème chapitre, notre modèle tumoral bio-imprimé en 3D est un modèle statique. Notre but ici était justement de l'améliorer en y apportant une dimension dynamique. Nous avons alors entrepris de concevoir un système microfluidique **nous permettant de mettre en culture les tissus tumoraux bio-imprimés sous flux physiologique permanant.** L'objectif étant justement de reproduire les conditions dynamiques associées au flux sanguin. Ce système devait par ailleurs répondre à la double exigence suivante :

- ✓ Simuler le trajet vasculaire du médicament en plus de son interaction avec le tissu tumoral bio-imprimé ;
- ✓ Permettre de tester, en même temps, plusieurs concentrations différentes de médicament sur un même support microfluidique.

Pour atteindre ces objectifs, nous avons structuré ce chapitre en 3 grandes phases :

- ✓ Conception d'un premier prototype que nous avons appelé « **système mono-serpentin** ». Le but de ce système est de pouvoir simuler le trajet vasculaire du médicament en plus de l'interaction avec le tissu tumoral ;
- ✓ Intégration des tissus tumoraux bio-imprimés au sein du système mono-serpentin et évaluation de leur viabilité après perfusion ;
- ✓ Conception d'un système **multi-serpentin**. Celui-ci constitue une version « améliorée » du système mono-serpentin. La plus-value de ce système multi-serpentin est de permettre de tester, en même temps, plusieurs concentrations différentes de médicament sur un même support.

La méthodologie appliquée pour chacune de ces phases a été décrite dans la 3ème partie du chapitre 2. Ici, nous allons décrire et discuter les résultats obtenus. Nous aborderons ensuite les limites de cette étude et les perspectives associées avant de conclure ce chapitre.

I. Résultats et discussion

I.1. Conception du système microfluidique mono-serpentin

I.1.1. Design du système mono-serpentin

Le design du système mono-serpentin a déjà été décrit dans le chapitre 2. Ici, nous allons le discuter plus en détail en précisant l'intérêt de chacune des parties qui le composent. Ce design est illustré par la Figure 5.51. Les dimensions clés du dispositif sont illustrées par la Figure 5.52.

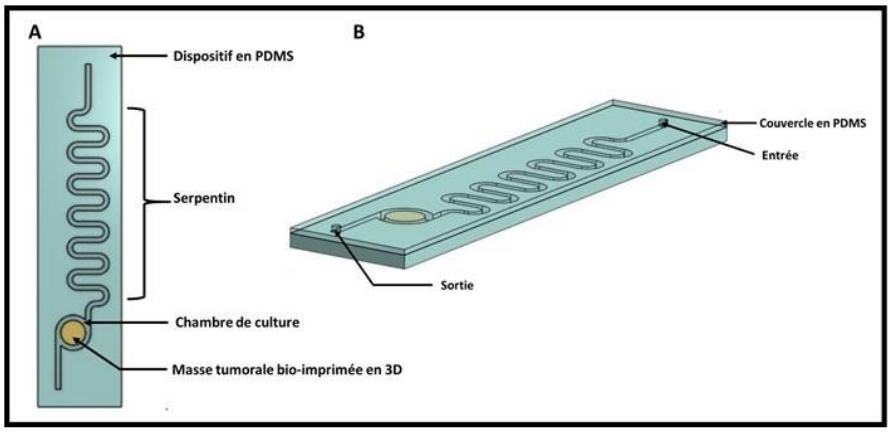


Figure 5.51. Design du système microfluidique mono-serpentin. A. Vue d'en haut (sans le couvercle en PDMS). B. Vue de profil (avec le couvercle en PDMS).

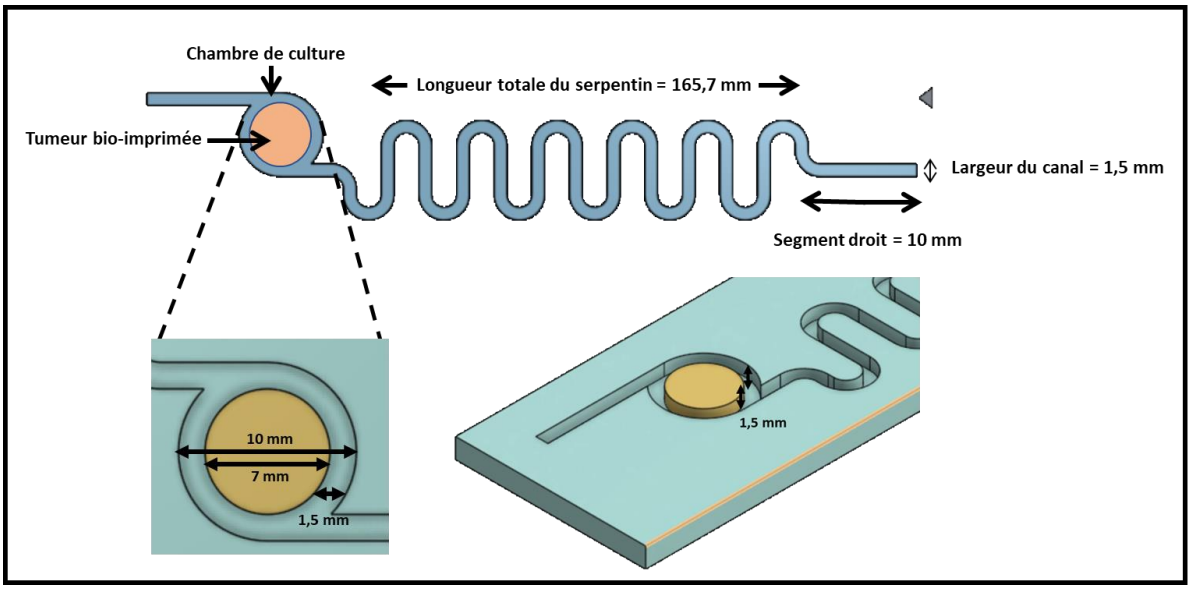


Figure 5.52. Dimensions clés du système mono-serpentin.

Comme illustré par la Figure 5.51, le système mono-serpentin se compose de deux couches en PDMS. La couche inférieure comprend le « motif microfluidique » (canal en serpentin + chambre de culture). La couche supérieure, quant à elle, fait officie de couvercle permettant le scellement du système.

Le motif microfluidique du système mono-serpentin peut être divisé en quatre parties :

- **Le segment droit en amont du serpentin**

Ce segment à une longueur de 10 mm. Il permet de disposer d'une marge pour créer l'entrée du système avant le début du serpentin ;

- **Le canal en serpentin**

Le rôle de ce canal en serpentin est de simuler le trajet vasculaire du médicament avant son interaction avec le tissu cancéreux. Cette forme en serpentin a été sélectionnée car elle permet de rallonger ce « chemin vasculaire » tout en maitrisant la taille globale du système. En effet pour une longueur donnée, un canal en serpentin occupe moins d'espace qu'un canal droit.

Pour fixer la longueur de ce serpentin, nous nous sommes basés sur le raisonnement suivant. La longueur totale du réseau capillaire au sein de l'organisme humain est estimée à 80 000 km[16]. Nous avons alors pris une échelle de 1 mm de canal microfluidique pour 500 km de

réseau capillaire. Nous souhaitions donc avoir une longueur de serpentin de 160 mm. Finalement au moment de réaliser le dessin, nous avons définitivement fixé la longueur totale du serpentin à 165,7 mm.

Bien entendu, nous sommes conscients que ce raisonnement « mathématique » n'implique pas forcément une pertinence biologique. Nous y reviendrons lorsque nous évoquerons les limites de cette étude.

- **La chambre de culture**

La chambre de culture est destinée à accueillir le modèle tumoral bio-imprimé. Elle a un diamètre de 10 mm et une profondeur de 1,5 mm. Rappelons par ailleurs que la tumeur bio-imprimée est de forme cylindrique avec un diamètre de 7 mm et une épaisseur de 1,5 mm. Ces dimensions permettent d'avoir, autour de la tumeur bio-imprimée, un espace de 1,5 mm de chaque côté au sein de la chambre de culture (Figure 5.52). Cet espace est destiné à permettre la circulation du milieu de culture autour de la tumeur au moment de la mise sous perfusion.

Notons également que l'épaisseur de la structure tumorale bio-imprimée est égale à la profondeur de la chambre de culture (1,5 mm) (Figure 5.52). De cette manière, le milieu de culture circule autour de cette structure mais ne passe pas au-dessus. La périphérie de la masse bio-imprimée est donc mieux perfusée que son centre. Le but de cette configuration est de favoriser la création d'une région hypoxique au centre de la tumeur bio-imprimée. En effet, l'hypoxie semble jouer un rôle important dans la physiopathologie du cancer ovarien et notamment dans la chimiorésistance[17]. Nous avons donc jugé utile de prendre en compte cet aspect dans le développement de notre modèle.

- **Le segment droit en aval de la chambre de culture**

Le rôle de ce segment est essentiellement technique. Il facilite la création de la sortie en la plaçant à distance de la chambre de culture.

I.1.2. Fabrication du système mono-serpentin

Grâce à l'approche par moulage, nous avons réussi à fabriquer des systèmes mono-serpentins en reproduisant fidèlement le design souhaité. Un exemple des systèmes fabriqués est illustré par la Figure 5.53.



Figure 5.53. Système mono-serpentin obtenu après fabrication et collage.

I.2. Intégration du modèle tumoral bio-imprimé au sein du système mono-serpentin

Dans cette expérience, nous avons intégré une tumeur bio-imprimée au sein du système mono-serpentin. Nous avons ensuite mesuré la viabilité de cette tumeur après 48 heures de perfusion continue sous flux physiologique (débit de 67,5 µL/min correspondant à une vitesse d'écoulement de 0,5 mm/s à la sortie du serpentin).

Le montage expérimental utilisé pour la mise sous perfusion est illustré par la Figure 5.54. Comme on peut le voir sur cette figure, la perfusion s'effectue en circuit fermé via une pompe péristaltique. Sachant que la chambre de culture a un rayon de 5 mm ; que la tumeur a un rayon de 3,5 mm et que les deux ont une hauteur de 1,5 mm on peut calculer le volume de milieu auquel une tumeur est exposée à un instant t :

- Volume de la chambre de culture : 5 x 5 x 3,14 x 1,5 = 117,75 µL
- Volume de la structure : 3,5 x 3,5 x 3,14 x 1,5 = 57,69 µL
- Le volume du milieu autour est donc de 117,75 – 57,69 soit = 60 µL environ
- Dans un puits d'une plaque 24 puits, on met 1000 µL de milieu de culture ;
- En statique, chaque structure est donc exposée à 16 fois plus de milieu qu'en dynamique à un instant t.

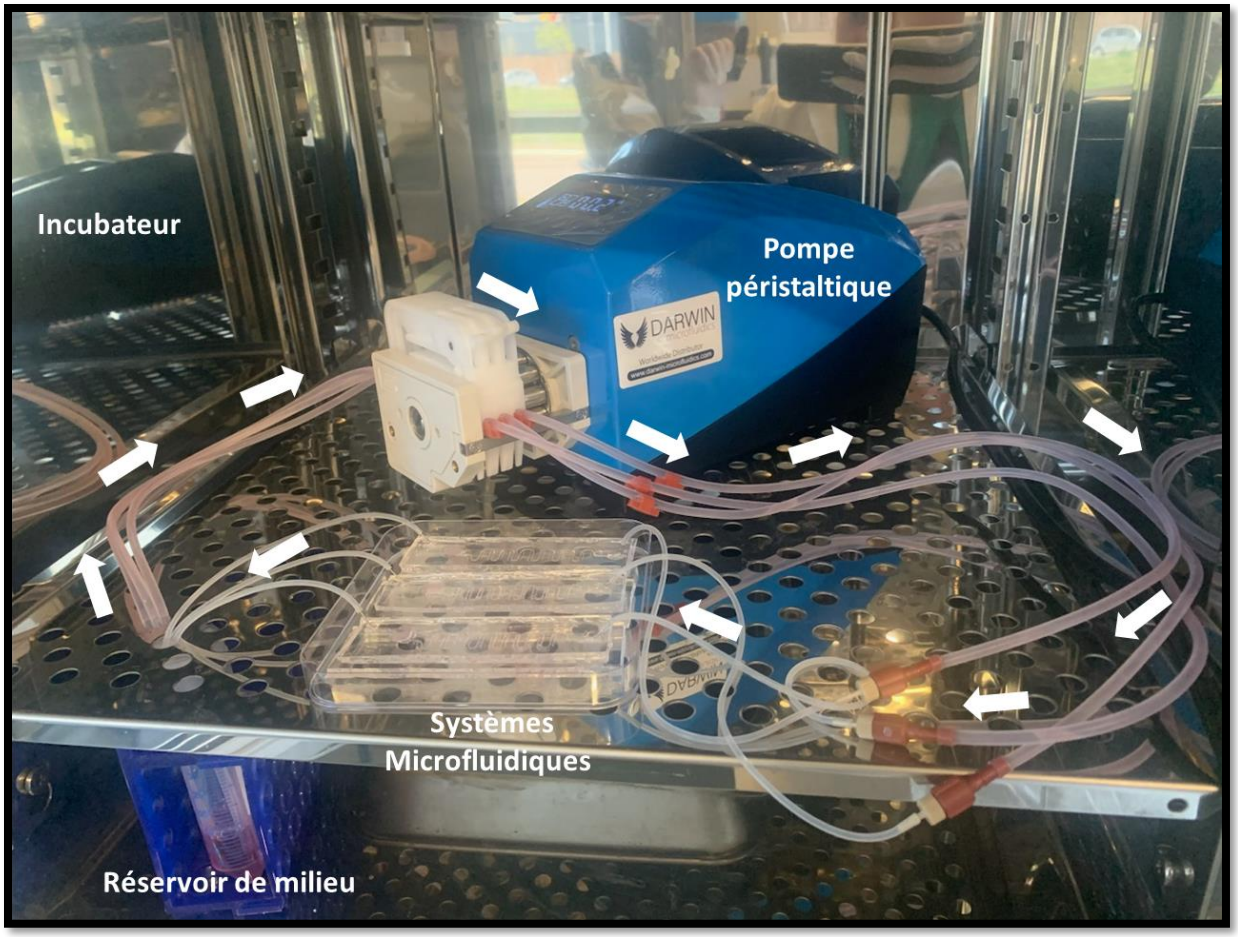


Figure 5.54. Montage expérimental utilisé pour la perfusion des tumeurs bio-imprimées au sein des systèmes à mono-serpentin. Les flèches blanches indiquent le sens de circulation du fluide.

La technique WST-1 a été utilisée pour estimer la viabilité des tumeurs après perfusion. Les résultats ont été exprimés en pourcentage de viabilité par rapport à des tumeurs cultivées dans les conditions statiques (non perfusées).

Cette expérience a été menée trois fois (trois réplicas biologique). Pour chaque réplica biologique, trois réplicas techniques ont été réalisés (trois systèmes avec trois tumeurs bio-imprimées). Les résultats obtenus pour chaque expérience sont illustrés par le Tableau 5.19.

.

Tableau 5.20. Viabilité des tumeurs bio-imprimées après intégration au sein du système mono-serpentin.

Réplica biologique (RB)	Réplica technique (RT)	% de viabilité par rapport aux conditions statiques	Commentaires
RB1	RT1	59,23	Les cases vides du tableau correspondent à des données non exploitables. Dans ces cas, les structures bio-imprimées n'ont pas pu être récupérées intégralement et la technique WST-1 n'a pas pu être réalisée.
	RT2	/	
	RT3	/	
RB2	RT1	62,56	
	RT2	133,17	
	RT3	/	
RB3	RT1	114,62	
	RT2	/	
	RT3	/	
% moyen de viabilité calculé sur les 4 données exploitables			92,40%
Ecart type correspondant (calculé sur les 4 données exploitables)			± 37,17%

L'analyse du Tableau 5.19 nous permet de faire plusieurs observations :

Dans plus de 50% des expériences réalisées (5/9), nous n'avons pas eu de résultats exploitables. Dans ces cas, il nous était impossible de récupérer les tumeurs pour pratiquer du WST-1 dessus car elles étaient devenues extrêmement fragiles et difficiles à manipuler. Il semble en effet que la mise sous perfusion des tumeurs bio-imprimées accélère considérablement leur délitement. Comme on l'avait vu dans le 3ème chapitre, ces modèles tumoraux commencent à devenir très difficiles à manipuler à partir du 7ème jour après culture sous conditions statiques car elles deviennent très fragiles. **Ce phénomène de « fragilisation au fil du temps » semble donc considérablement accéléré par la mise sous flux**.

D'un autre côté, si on regarde les données « exploitables », on se rend compte que le taux de viabilité fluctue très fortement d'une expérience à l'autre. Il faut donc rester très prudent vis-

à-vis des résultats obtenus. A notre sens, aucune conclusion ne peut s'en dégager à ce stade. Ces fluctuations des résultats peuvent être dues à plusieurs raisons :

- ✓ Les difficultés rencontrées lors de la récupération des structures bio-imprimées : Celles-ci deviennent en effet extrêmement fragiles après 48 heures de perfusion ;
- ✓ Les problèmes de fuites au moment de la mise sous perfusion : En dépit de nos efforts nous avons en effet enregistré plusieurs fuites sur les dispositifs mono-serpentin. Ces fuites modifient forcément les conditions expérimentales et peuvent donc impacter la reproductibilité des résultats. Nous aborderons ce problème de fuites plus en détail lorsque nous évoquerons les limites de cette étude ;
- ✓ Enfin, il convient aussi de souligner que ces résultats reflètent les toutes premières tentatives d'exécution de cette expérience. On peut donc considérer que les protocoles appliqués sont encore en phase de mise au point. Malheureusement, il s'agit aussi des toutes dernières manipulations qui ont été effectuées dans le cadre de ce projet de thèse. Le temps imparti ne suffisait pas pour les reprendre en vue de les améliorer. Bien entendu, nous reviendrons sur les améliorations possibles lorsque nous évoquerons les limites et les perspectives de cette étude.

I.3. Conception du système microfluidique à cinq serpentins

I.3.1. Rappel des objectifs à atteindre

A travers le système mono-serpentin, nous avons proposé un concept permettant d'étudier, sur un même modèle, le trajet vasculaire du médicament en plus de son interaction avec le tissu cancéreux. Grâce au système à 5 serpentins, nous souhaitions aller un peu plus loin. Notre objectif était de pouvoir tester, en même temps, plusieurs concentrations différentes de médicament sur un même support microfluidique.

La méthodologie de travail visant à mettre au point ce système à 5 serpentins a été détaillée dans le 2ème chapitre de ce manuscrit. Ici, nous allons voir plus en détail les différentes phases par lesquelles est passé le développement de ce système.

Pour que notre discours soit compréhensible, nous allons commencer par rappeler le design de la version « la plus aboutie » du système à 5 serpentins. Ensuite, nous allons décrire les étapes ayant conduit à son élaboration.

Le design du système à 5 serpentins dans sa version la plus évoluée est illustré par la Figure 5.55.

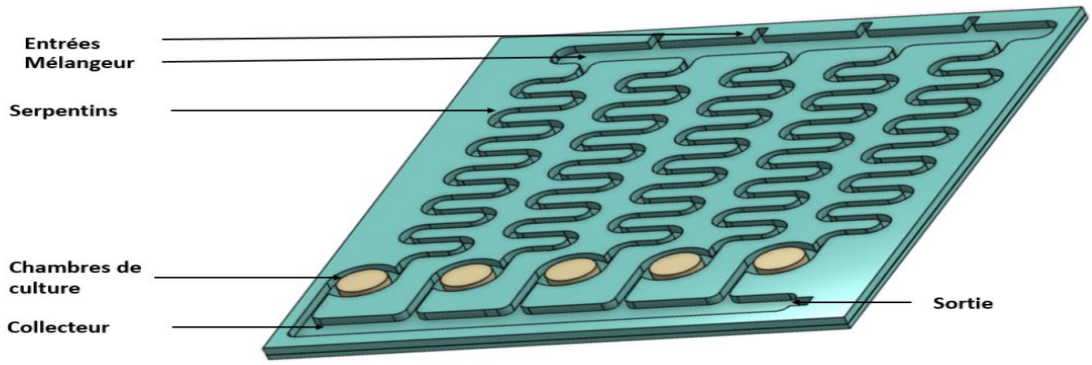


Figure 5.55. Design du système microfluidique à cinq serpentins.

Comme on peut le voir sur la Figure 5.55, le système à 5 serpentins est équipé d'un mélangeur disposant de 4 entrées et 5 sorties. Chaque sortie se prolonge par un canal en serpentin qui aboutit à une chambre de culture.

Pour créer ce dispositif, nous avons dû faire des simulations en mécanique des fluides numérique (CFD). L'objectif premier était de concevoir un design permettant d'avoir, à la sortie de chaque serpentin, une concentration différente de principe actif en partant d'une même solution initiale. Nous devions par ailleurs avoir une concentration nulle à la sortie de l'un des serpentins (témoin non exposé). Enfin, nous devions avoir une répartition « pertinente » des différentes concentrations aux sorties des serpentins. Le lecteur peut se référer à la 3ème partie du chapitre 2 pour avoir plus de détails sur ces trois objectifs.

Nous allons maintenant commencer à raconter le cheminement ayant abouti au design illustré par la Figure 5.55. Commençons par définir certaines notations et certains termes :

- ✓ La lettre E désignera une entrée du mélangeur ;
- ✓ La lettre S désignera une sortie de serpentin ;
- ✓ Les entrées et les sorties seront numérotées de gauche à droite (dans le sens des aiguilles d'une montre) ;
- ✓ La notation S_M désignera la solution médicamenteuse initiale considérée pour faire les simulations. La concentration de cette solution sera notée C_M ;
- ✓ La notation Solv sera utilisée pour désigner le solvant pur choisi pour préparer la solution S_M. Bien entendu, la concentration du solvant en médicament est nulle.

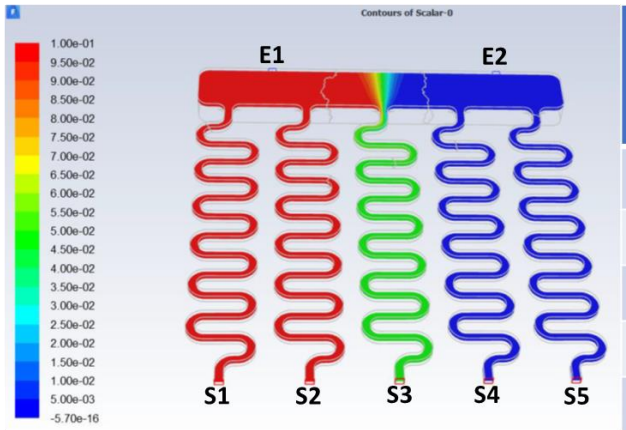
I.3.2. Le système à 2 entrées et 5 sorties (2E5S)

Au début, nous avons conçu une géométrie comprenant uniquement deux entrées pour le mélangeur. Cette géométrie a été utilisée pour réaliser une première simulation. Les entrées ont été utilisées comme suit :

- ✓ L'entrée E1 a été utilisée pour injecter la solution S_M (solution médicamenteuse aqueuse de doxorubicine à 0,1 mM) à une vitesse de 1,25 mm/s ;
- ✓ L'entrée E2 a été utilisée pour injecter de l'eau distillée (solvant pur) à une vitesse de 1,25 mm/s.

Les vitesses aux entrées E1 et E2 ont été fixées de telle sorte à avoir une vitesse d'écoulement de 0,5 mm/s à la sortie de chaque serpentin.

Les résultats de cette simulation sont illustrés par la Figure 5.56.



Sortie	Concentration en principe actif (en % par rapport à C_M)
S1	100%
S2	100%
S3	50%
S4	0
S5	0

Figure 5.56. Résultats de la simulation 1 avec le système 2ES5.

Comme on peut le voir sur la Figure 5.56, Cette première simulation ne nous a pas permis d'atteindre les objectifs visés à travers le système à cinq serpentins. En effet, nous n'avons eu que trois concentrations différentes sur les cinq sorties disponibles. Aux sorties S1 et S2, nous avons eu une concentration égale à C_M. A l'inverse, dans les serpentins S4 et S5 on a observé une concentration nulle en principe actif.

Nous avons également observé, dans le mélangeur à mi-distance entre les deux entrées, la formation d'une « zone de rencontre » entre la solution S_M et le solvant pur. Cette zone de mélange a abouti, dans le 3ème serpentin, à la création d'une nouvelle solution dont la concentration ($0{,}5C_M$) était différente de zéro et de C_M.

A partir de cette observation, nous avons émis l'hypothèse suivante : la multiplication des entrées dans le mélangeur permettrait d'augmenter le nombre de « zones de rencontre » et pourrait potentiellement générer d'autres points de concentrations aux sorties des serpentins.

Pour explorer cette hypothèse, nous avons conçu une nouvelle géométrie avec 6 entrées et 5 sorties. C'est le système 6E5S.

I.3.3. Le système à 6 entrées et 5 sorties (6E5S)

La géométrie du système 6ES5 est illustrée par la Figure 5.57.

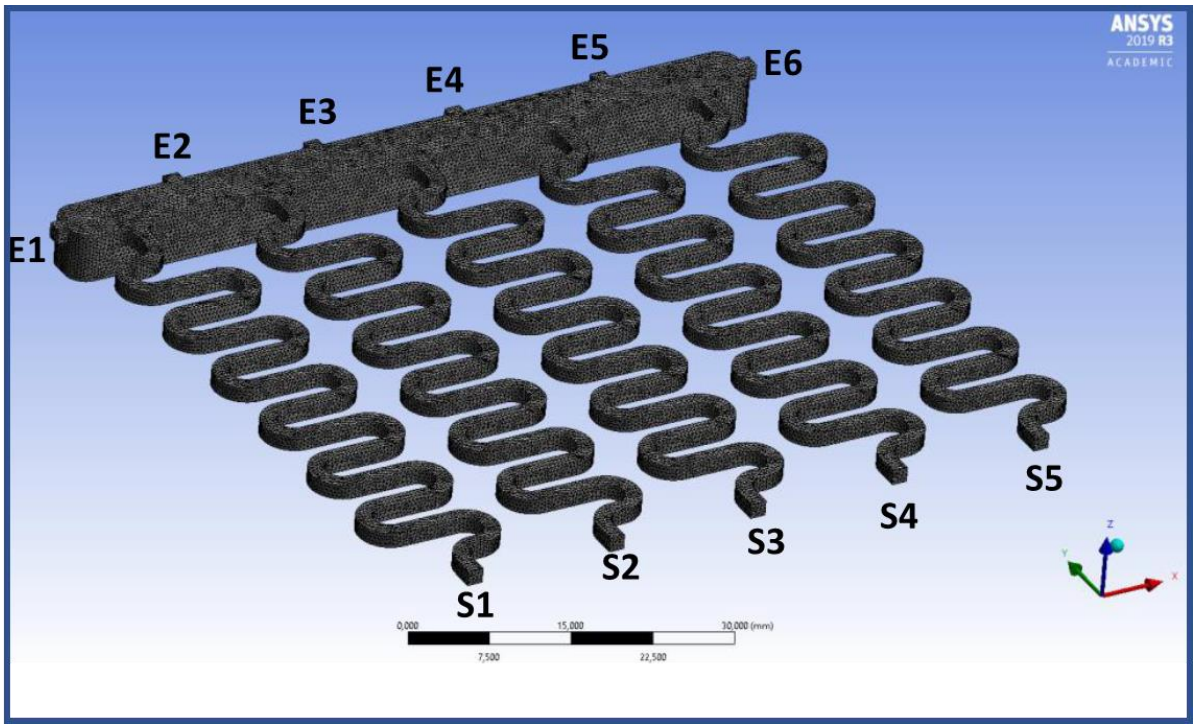


Figure 5.57. Géométrie du système 6E5S.

Nous avons utilisé cette géométrie pour réaliser plusieurs simulations. Ces dernières ont été exécutées en prenant en compte les considérations suivantes :

- ✓ Comme solvant, nous avons considéré le milieu de culture DMEM supplémenté avec 10% de SVF et chauffé à 37°C ;
- ✓ Pour la solution S_M : Nous avons considéré une solution médicamenteuse de doxorubicine à 5,8 µg/mL (soit environ 10 µM) dans le milieu (DMEM + 10% de SVF).

Pour le paramétrage des simulations, il est indispensable de renseigner un certain nombre de données relatives au solvant et au soluté considérés. Nous résumons cela dans le Tableau 5.21.

Tableau 5.21. Propriétés du solvant et du soluté prises en compte pour les simulations avec le système 6E5S.

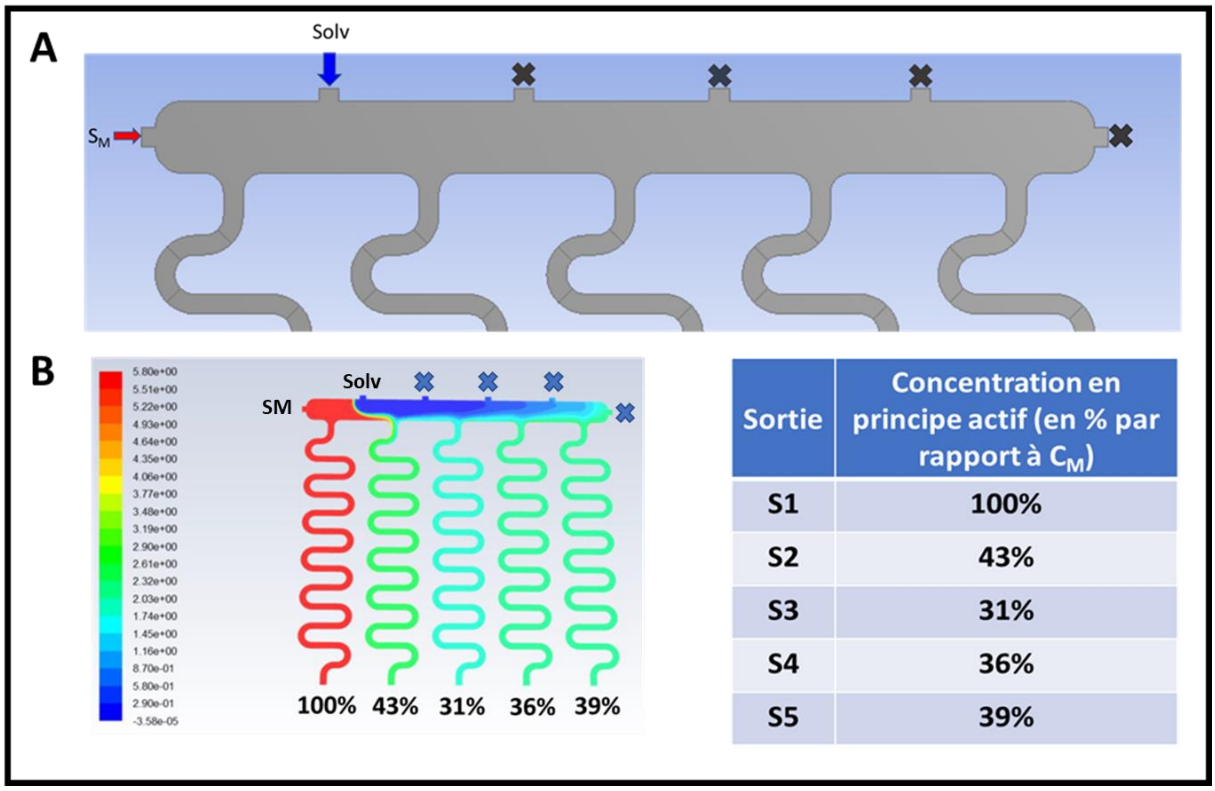
Paramètre	**Valeur**	**Unité**	**Réf.**
Masse volumique du solvant	1007	Kg/m^3	[18]
Viscosité dynamique du solvant	7.266×10^{-4}	Kg/m/s	[18]
Coefficient de diffusion de la doxorubicine dans le solvant considéré	$9{,}964 \times 10^{-10}$	m^2/s	[19]

- **Simulation 1**

Pour cette première simulation avec le système 6ES5, deux entrées ont été exploitées (Figure 5.58A) :

- ✓ E1 : Perfusion de la solution S_M ;
- ✓ E2 : Perfusion de solvant (Solv).

Les vitesses d'écoulement imposées aux 2 entrées E1 et E2 (1,25 mm/s) ont été calculées de telle sorte à avoir une vitesse d'écoulement de 0,5 mm/s à la sortie de chaque serpentin. Les autres entrées n'ont pas été utilisées. Les résultats obtenus suite à cette simulation sont illustrés par la Figure 5.58B



Sortie	Concentration en principe actif (en % par rapport à C_M)
S1	100%
S2	43%
S3	31%
S4	36%
S5	39%

Figure 5.58. Simulation 1 avec le système 6E5S. A. Conditions initiales. B. Résultats obtenus.

Cette simulation ne nous a pas permis d'atteindre nos objectifs pour deux raisons :

- ✓ Aucune sortie n'a donné une concentration nulle en principe actif ;
- ✓ Les points de concentration aux sorties S4 et S5 en particulier étaient beaucoup trop rapprochés.

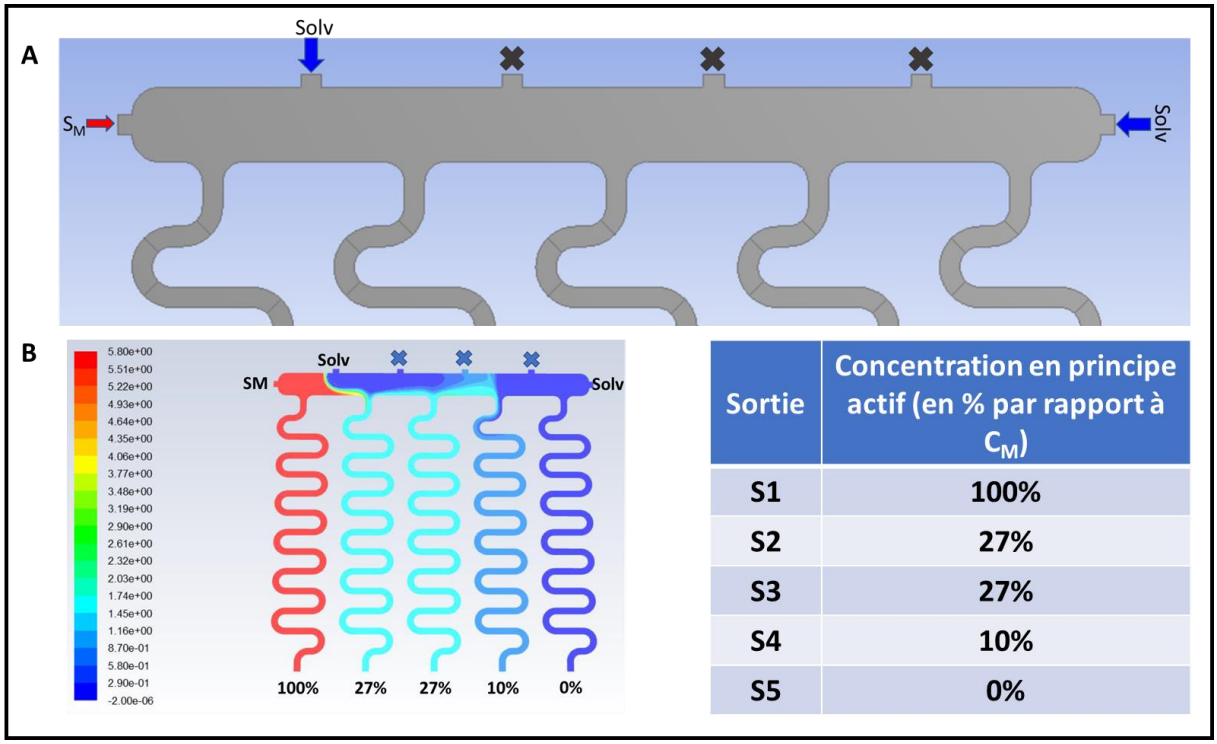
Pour essayer de créer des points de concentration plus écartés, nous avons tenté d'améliorer cette configuration en y ajoutant un point d'injection supplémentaire de solvant. Nous avons alors pensé à exploiter l'entrée E6 en plus des entrées E1 et E2. L'idée était de créer une « dilution supplémentaire » notamment aux sorties S4 et S5. C'est ainsi que nous avons lancé la simulation 2.

- ➢ **Simulation 2**

Pour cette simulation nous avons donc exploité l'entrée E6 en plus des entrées E1 et E2.

- ✓ E1 : Perfusion de la solution S_M ;
- ✓ E2 : Perfusion de solvant (Solv) ;
- ✓ E6 : Perfusion de solvant (Solv).

Les vitesses d'écoulement imposées aux 3 entrées E1, E2 et E6 (0,83 mm/s) ont été calculées de telle sorte à avoir une vitesse d'écoulement de 0,5 mm/s à la sortie de chaque serpentin. Les autres entrées n'ont pas été utilisées (Figure 5.59A). Les résultats obtenus suite à cette simulation sont illustrés par la Figure 5.59B.



Sortie	Concentration en principe actif (en % par rapport à C_M)
S1	100%
S2	27%
S3	27%
S4	10%
S5	0%

Figure 5.59. Simulation 2 avec le système 6E5S. A. Conditions initiales. B. Résultats obtenus.

Comme on peut le voir sur la Figure 5.59, l'addition d'un point d'injection de solvant à l'entrée E6 a bien permis de diluer les solutions aux sorties S4 et S5. Les concentrations à ces sorties sont ainsi passées respectivement de 36% et 39% dans la simulation 1 à 10% et 0 dans la simulation 2. Par ailleurs, l'apparition de ce point de concentration de zéro à l'entrée S5 est conforme avec nos objectifs.

Cependant, on a obtenu des concentrations identiques aux sorties S2 et S3. Or ceci ne correspond pas à notre cahier des charges initial.

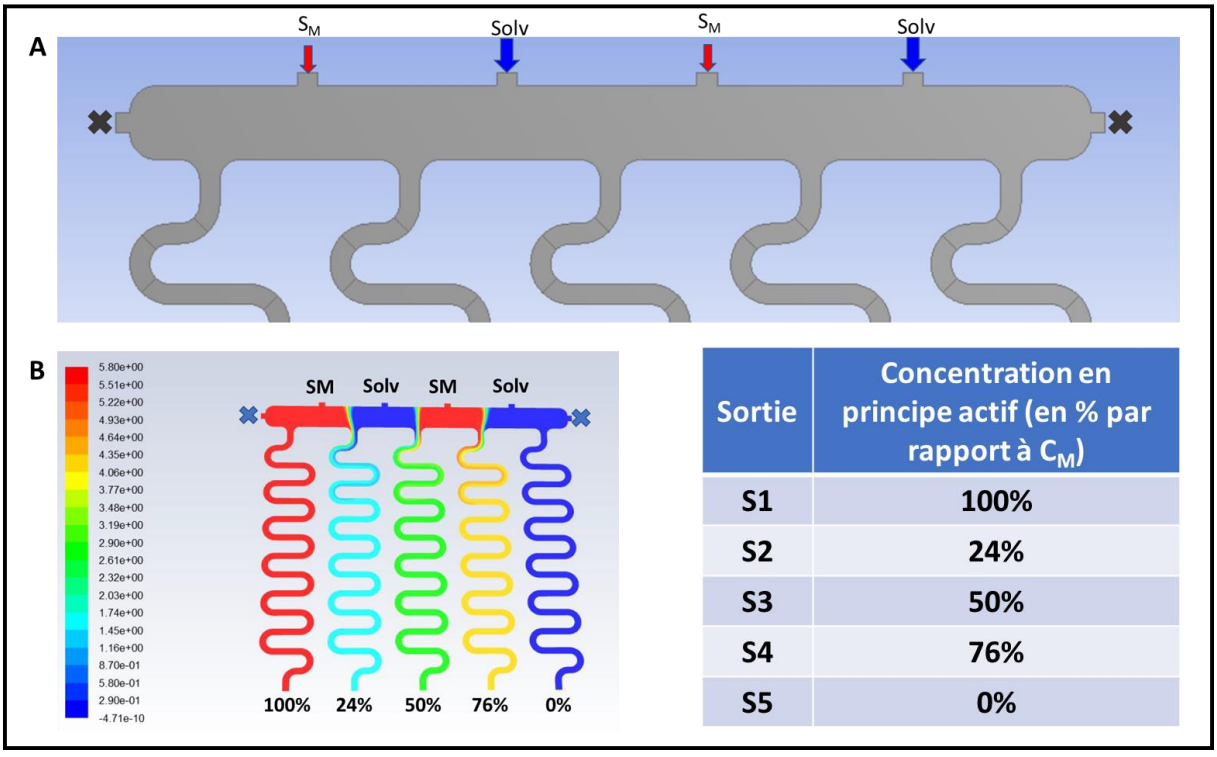
Nous avons alors envisagé une autre possibilité. Pour multiplier les zones de mélange, nous avons tenté d'exploiter les entrées E2 à E5 pour réaliser des perfusions de solution S_M et de solvant selon une disposition alternée. C'est ce en quoi consiste la simulation 3.

➢ **Simulation 3**

Dans cette simulation, nous avons donc exploité les entrées E2 à E5 de la manière suivante (Figure 5.60A) :

- ✓ E2 : Perfusion de la solution S_M ;
- ✓ E3 : Perfusion de solvant (Solv) ;
- ✓ E4 : Perfusion de la solution SM ;
- ✓ E5 : Perfusion de solvant (Solv).

Les vitesses d'écoulement imposées aux 4 entrées E2, E3, E4 et E5 (0,625 mm/s) ont été calculées de telle sorte à avoir une vitesse d'écoulement de 0,5 mm/s à la sortie de chaque serpentin. Les entrées latérales E1 et E6 n'ont pas été utilisées. Les résultats obtenus suite à cette simulation sont illustrés par la Figure 5.60B.



Sortie	Concentration en principe actif (en % par rapport à C_M)
S1	100%
S2	24%
S3	50%
S4	76%
S5	0%

Figure 5.60. Simulation 3 avec le système 6E5S. A. Conditions initiales. B. Résultats obtenus.

Cette simulation nous a permis d'atteindre les trois objectifs fixés initialement :

- ✓ Une concentration différente à la sortie de chaque serpentin ;
- ✓ Un serpentin avec une concentration nulle en médicament ;

- ✓ Une répartition « cohérente » des concentrations : en effet, les écarts entre les différents points de concentration obtenus étaient quasi constants (environ -25% à chaque fois). De plus, cette répartition permet de couvrir une plage de concentration relativement large. Cette configuration nous a donc paru pertinente pour faire des tests de cytotoxicité. Ainsi, nous avons décidé de la garder pour la suite de notre étude.

Dans la configuration de la simulation 3, les entrées latérales E1 et E6 ne sont pas utilisées (Figure 5.60A). Nous avons donc décidé de les supprimer. C'est ainsi qu'est né le système à 4 entrées et 5 sorties illustré par la Figure 5.55. Il s'agit du « produit final » de cette série de simulations.

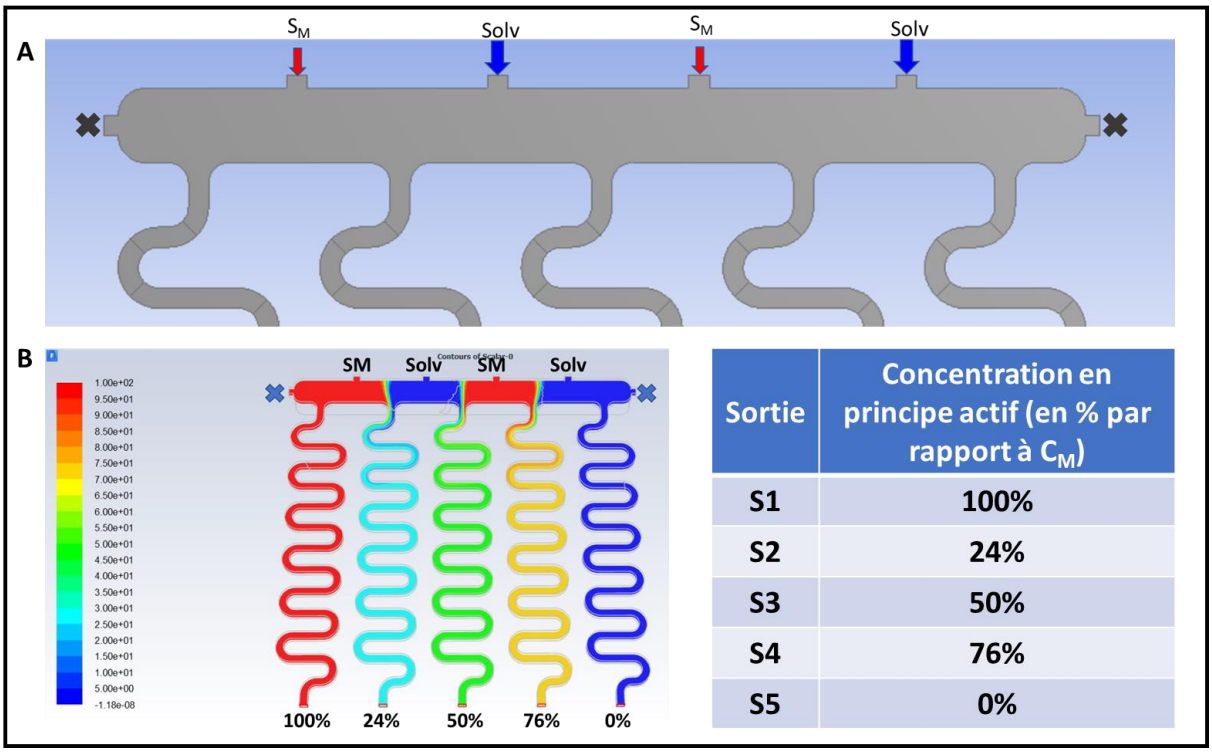
Dans ce système, les serpentins sont donc là pour simuler le trajet vasculaire du médicament avant son interaction avec le tissu cancéreux. En observant la Figure 5.60B, on se rend compte qu'ils jouent un autre rôle important : ils permettent d'homogénéiser les différentes solutions créées dans le mélangeur. Ceci est particulièrement visible dans les serpentins 2, 3 et 4. A la sortie du mélangeur, les solutions dans ces serpentins ne sont pas homogènes. Le mélange se poursuit au fur et à mesure du cheminement dans les serpentins pour donner, à leurs sorties, des solutions homogénéisées.

Après avoir eu ces premiers résultats, nous avons souhaité savoir s'ils étaient dépendants (ou pas) d**e la nature et de la concentration du soluté**. Dans notre esprit, le but était de savoir si ces résultats étaient transposables à d'autres solutions plus ou moins concentrées en doxorubicine ou à des solutions d'autres principes actifs. Nous allons voir ça dans le prochain titre

I.3.4. Influence de la concentration et de la nature du soluté

- ➢ **Influence de la concentration**

Pour savoir si les résultats de la simulation 3 décrite ci-dessus étaient dépendants ou pas de la concentration, nous avons repris cette simulation avec une solution à 100 µg/mL de doxorubicine (contre 5,8 µg/mL dans la simulation initiale). Les résultats obtenus sont illustrés par la Figure 5.61B.



Sortie	Concentration en principe actif (en % par rapport à C_M)
S1	100%
S2	24%
S3	50%
S4	76%
S5	0%

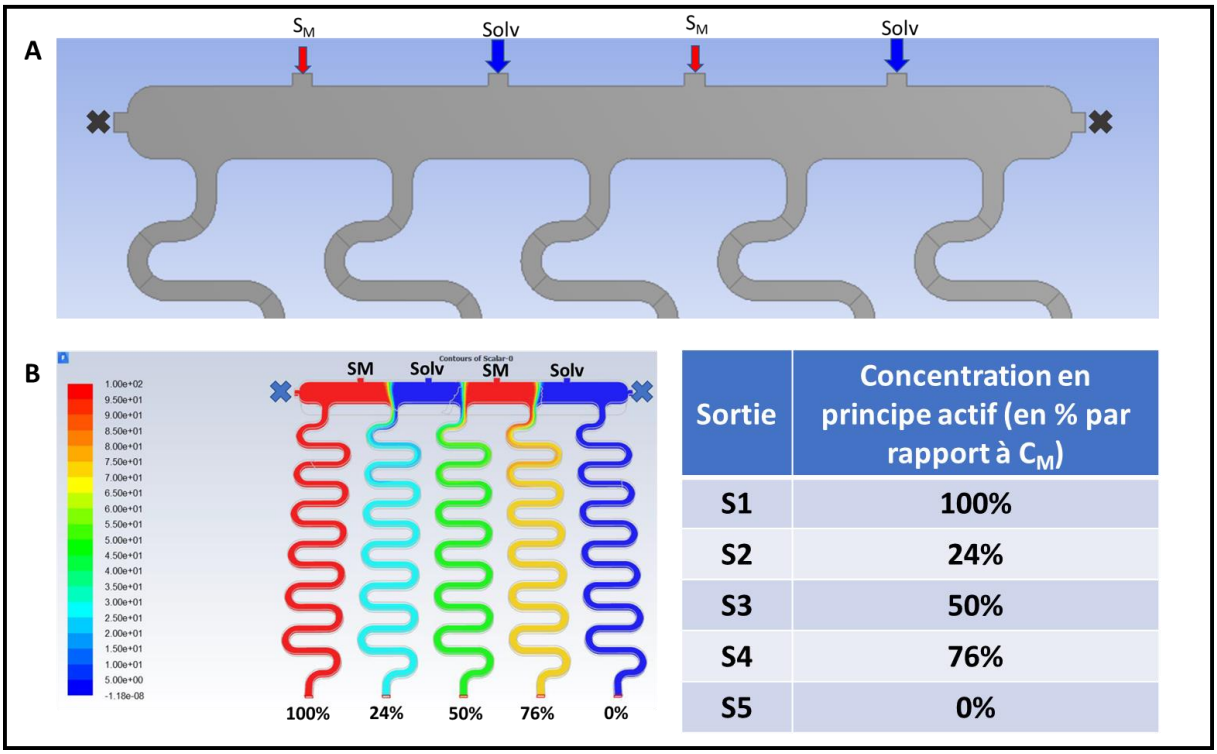
Figure 5.61. Simulation avec une solution S_M à 100 µg/mL.

Une observation comparée des Figure 5.60 et Figure 5.61 nous permet de constater la similitude des résultats entre les deux simulations. La répartition des concentrations aux sorties des serpentins n'a pas été modifiée par l'augmentation de la concentration. Bien entendu, cette simulation à elle seule ne permet pas de tirer une conclusion générale par rapport à l'impact de la concentration de la solution S_M. Elle semble néanmoins indiquer qu'une augmentation de la concentration de 5,8 µg/mL à 100 µg/mL (d'un facteur de 17,2 environ) n'a pas d'influence sur les concentrations obtenues aux sorties des serpentins.

- **Influence du soluté**

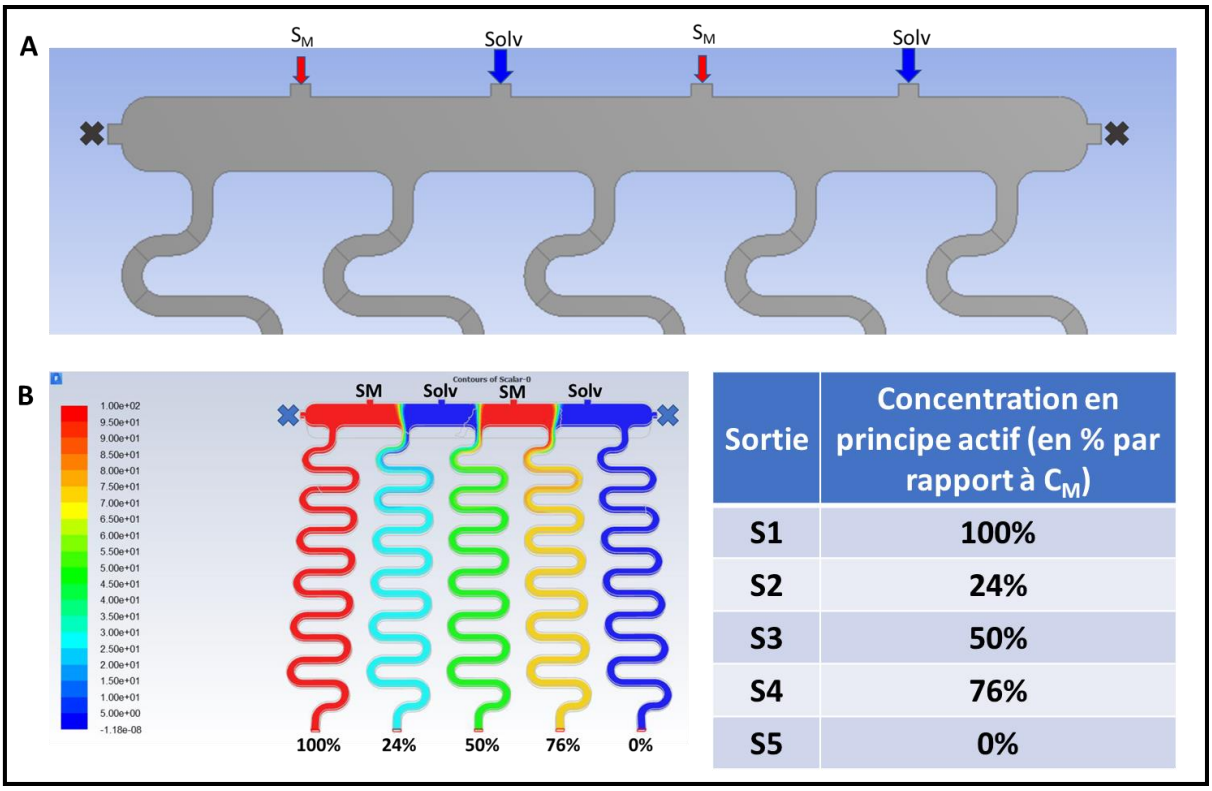
Dans les simulations que nous avons effectuées, le soluté intervient par son **coefficient de diffusion** dans le solvant considéré. Nous avons donc souhaité évaluer l'impact de la modification de ce paramètre (coefficient de diffusion) sur les résultats obtenus.

Nous avons effectué deux simulations en augmentant ou en diminuant le facteur de diffusion appliqué initialement (cf. Tableau 5.21). La Figure 5.62 illustre les résultats obtenus avec une solution S_M à 100 µg/mL et un coefficient de diffusion mille fois supérieur. La Figure 5.63 illustre les résultats obtenus avec une solution S_M à 100 µg/mL et un coefficient de diffusion mille fois inférieur.



Sortie	Concentration en principe actif (en % par rapport à C_M)
S1	100%
S2	24%
S3	50%
S4	76%
S5	0%

Figure 5.62. Simulation avec C_M = 100 µg/mL et un coefficient de diffusion 1000 fois supérieur à celui appliqué initialement.



Sortie	Concentration en principe actif (en % par rapport à C_M)
S1	100%
S2	24%
S3	50%
S4	76%
S5	0%

Figure 5.63. Simulation avec C_M = 100 µg/mL et un coefficient de diffusion 1000 fois inférieur à celui appliqué initialement.

Là encore, la modification du coefficient de diffusion ne semble pas influencer les concentrations obtenues aux sorties des différents serpentins. Par conséquent, il est possible de remplacer la doxorubicine par un autre principe actif ayant un coefficient de diffusion différent et avoir la même répartition des concentrations aux différentes sorties.

Donc à l'issue de cette phase de simulation, nous avons fixé un design final pour le système à cinq serpentins. La prochaine étape était de valider expérimentalement les résultats obtenus à travers la CFD. C'est ce dont nous allons parler dans le prochain paragraphe.

I.3.4. Validation expérimentale des premiers prototypes du système à cinq serpentins

Nous avons commencé par fabriquer un système à cinq serpentins « adapté » pour la validation des concentrations aux différentes sorties. Une photo de ce système est illustrée par la Figure 5.64.



Figure 5.64. Système à 5 serpentins utilisé pour la validation expérimentale des résultats.

Comme on peut le voir sur la Figure 5.64, notre système comporte 4 entrées et 5 sorties. Les 4 entrées sont numérotées de E1 à E4 (de gauche à droite). Les sorties sont numérotées de S1 à S5 (de gauche à droite également). L'absence des chambres de culture permet de récolter les différentes solutions directement aux sorties des serpentins.

Pour mener cette validation, nous avons procédé en deux temps : nous avons commencé par une phase qualitative puis nous sommes passés à la phase quantitative.

- **Validation qualitative des résultats**

Pour la validation qualitative, nous avons perfusé une solution aqueuse de bleu patenté V à travers le système microfluidique à 5 serpentins. La perfusion a été réalisée de telle sorte à respecter au mieux les conditions imposées lors de la Simulation 3 :

- ✓ E1 : Solution de bleu patenté V à 0,625 mm/s (débit appliqué = 84,37 µL/min) ;
- ✓ E2 : Solvant pur (eau distillée) à 0,625 mm/s (débit appliqué = 84,37 µL/min) ;
- ✓ E3 : Solution de bleu patenté V à 0,625 mm/s (débit appliqué = 84,37 µL/min) ;
- ✓ E4 : Solvant pur (eau distillée) à 0,625 mm/s (débit appliqué = 84,37 µL/min).

Un pousse-seringue a été utiliser pour la perfusion. Les résultats obtenus sont illustrés par la Figure 5.65.

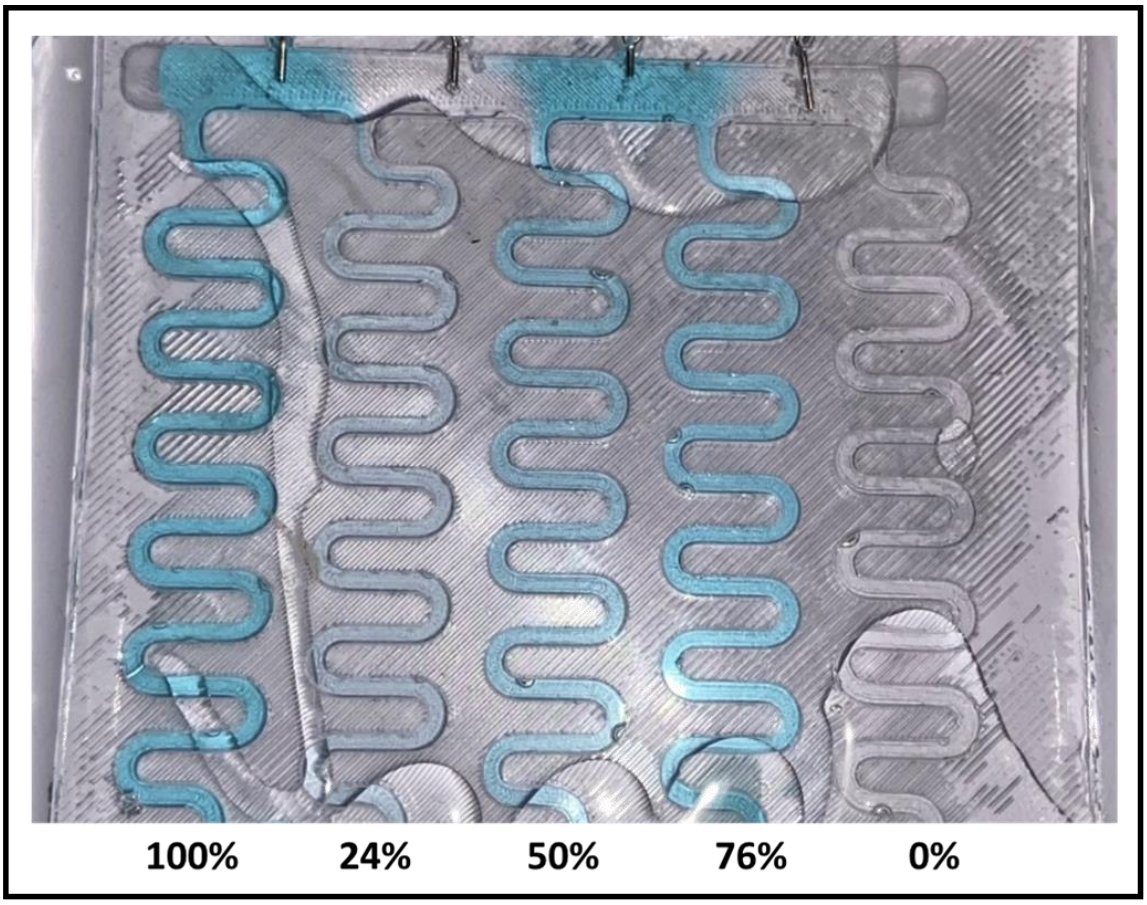


Figure 5.65. Résultats de la validation qualitative du système à 5 serpentins. Les pourcentages de concentration indiqués sont ceux prédits par la simulation (par rapport à la concentration de la solution mère).

Comme on peut le voir sur la Figure 5.65, la distribution du colorant dans les serpentins semble visuellement confirmer les prédictions des simulations numériques. On note par exemple que l'intensité du colorant au serpentin 1 (tout à fait à gauche) est similaire à celle de la solution mère perfusée aux entrées E1 et E3. A contrario, la solution dans le serpentin 5 (tout à fait à

droite) semble totalement transparente (comme l'eau distillée). Or la simulation prédit justement une concentration de zéro à ce niveau.

Bien entendu il ne s'agissait là que d'observations très approximatives. Elles semblaient cependant encourageantes pour passer à l'étape suivante à savoir la validation quantitative. C'est ce que nous allons aborder dans le prochain titre.

- **Validation quantitative des résultats**

Pour valider quantitativement les résultats numériques, nous avons perfusé, dans le système à cinq serpentins, une solution de doxorubicine à 100 µg/mL (préparée dans du PBS). Les solutions à la sortie de chaque serpentin ont ensuite été recueillies et leurs concentrations ont été déterminées par spectroscopie à 487 nm.

La perfusion a été réalisée de telle sorte à respecter au mieux les conditions imposées lors de la Simulation 3 :

- ✓ E1 : Solution de doxorubicine à 0,625 mm/s (débit appliqué = 84,37 µL/min) ;
- ✓ E2 : Solvant pur (PBS) à 0,625 mm/s (débit appliqué = 84,37 µL/min) ;
- ✓ E3 : Solution de doxorubicine à 0,625 mm/s (débit appliqué = 84,37 µL/min) ;
- ✓ E4 : Solvant pur (PBS) à 0,625 mm/s (débit appliqué = 84,37 µL/min).

Un pousse-seringue a été utiliser pour la perfusion. Le montage expérimental mis en place est illustré par la Figure 5.66.



Figure 5.66. Montage expérimental utilisé pour valider le système à cinq serpentins.

Cette expérimentation a été réalisée un grand nombre de fois au cours de cette thèse. Néanmoins, nous n'avons malheureusement pas réussi à avoir des résultats reproductibles. En effet, les concentrations mesurées aux sorties des serpentins semblaient fluctuer grandement en fonction des essais en étant souvent très éloignées des concentrations théoriques (prédites par les simulations). Par ailleurs, dans la majorité des manipulations réalisées, nous n'avions pas pu mener l'expérience à son terme en raison de la manifestation d'un grand nombre de problèmes techniques différents (fuites, problèmes de progression du fluide etc.). Ces problèmes seront évoqués et discutés en détail lorsque nous aborderons les limites de cette étude.

A la fin du temps imparti pour cette thèse, nous avons donc été obligés de suspendre les manipulations de validation quantitative de ce système. Cependant, la continuité du travail sera assurée dans le cadre de nouveaux projet doctoraux qui prendront la suite de celui-ci. L'un des objectifs de ces nouveaux projets sera justement de valider définitivement les résultats théoriques et d'optimiser ce dispositif en vue d'un potentiel transfert de technologie vers le monde industriel. En effet et suite aux conseils de la Société d'Accélération de Transfert de Technologies (SATT) Sayens, un brevet a été déposé sur la base du design du système à cinq serpentins sous le numéro n° FR2204667 le 17 mai 2022.

II. Limites de cette étude et perspectives de recherche associées

II.1. Introduction

En observant les résultats mitigés exposés dans ce chapitre, le lecteur pourra certainement entrevoir l'ensemble des « difficultés » auxquelles nous avons dû faire face dans le cadre de ce volet microfluidique. Une bonne partie de l'énergie déployée au cours de ce projet de thèse était d'ailleurs dédiée à comprendre et à essayer de surmonter ces difficultés.

Dans ce paragraphe, nous allons aborder en détail les principaux problèmes rencontrés et les efforts déployés pour les résoudre. Même s'il ne s'agit pas de « résultats publiables », nous espérons que ces informations seront utiles aussi bien aux membres de notre équipe qui prennent la suite de ce projet qu'à la communauté scientifique en général.

Pour être plus facilement exploitable, ce titre sera organisé en deux grandes parties :

- ✓ Dans un premier temps, nous allons évoquer les limites « théoriques » associées à la conception et aux designs de nos systèmes microfluidiques. Ceci nous permettra de souligner les axes de recherche qui peuvent être mis en place afin d'améliorer ces systèmes ;
- ✓ Dans un second temps, nous parlerons des problèmes « techniques » associés à la fabrication et à la manipulation de ces systèmes microfluidiques. Nous décrirons les approches que nous avons tentées pour résoudre ces problèmes et nous évoquerons leurs avantages et leurs limites.

II.2. Les limites associées à la conception des systèmes microfluidiques

II.2.1. La longueur du trajet vasculaire

Dans nos système microfluidiques, les canaux en serpentins ont vocation à simuler le trajet vasculaire du médicament. Le but étant d'étudier certains phénomènes intervenant au cours de cette phase vasculaire et notamment la formation de la couronne de protéines autour des nanoparticules médicamenteuses. Or ce phénomène est temps-dépendant. La couronne protéique se forme dans les 30 premières secondes suivant la mise en contact avec les protéines plasmatiques[20]. Cependant, sa composition et ses propriétés peuvent largement évoluer au fil du temps (jusqu'à 48 heures après l'entrée en contact des nanoparticules avec les protéines)[21].

D'un autre côté, la longueur de notre canal en serpentin est d'environ 165 mm. Avec une telle longueur et en considérant une vitesse d'écoulement de 0,5 mm/s, le temps de passage du fluide y est de 330 secondes (soit 5 minutes et 30 secondes). On pourrait alors se poser la question de savoir si un temps de passage aussi court est suffisant pour étudier les phénomènes associés à la couronne protéique.

II.2.2. La taille de la section du canal en serpentin

Le réseau vasculaire humain est constitué majoritairement par des capillaires dont le diamètre est de l'ordre de 8 µm[22]. Dans nos systèmes, le trajet vasculaire est simulé par un canal en serpentin dont la section est un carré de 1,5 mm de côté. On termes de dimensions, notre modèle est donc très éloigné de la réalité biologique.

II.2.3. Le niveau de la contrainte de cisaillement

La contrainte de cisaillement (exprimée en Pa) est la force appliquée par le flux sanguin de manière tangentielle à la surface interne du vaisseau[23]. Cette force intervient dans un grand

nombre de phénomènes et notamment dans la formation de la couronne protéique autour des nanoparticules médicamenteuses[24]. Les valeurs physiologiques (*in vivo*) de la contrainte de cisaillement dans la microcirculation sont de l'ordre de 1,5 Pa[25]. Dans notre système à cinq serpentins, les simulations ont révélé des valeurs de l'ordre de 10^{-4} à 10^{-3} Pa (Figure 5.67).

La valeur de la contrainte de cisaillement dans notre système est donc très éloignée des valeurs physiologiques. Ceci s'explique notamment par le fait que la section de nos canaux est largement supérieure au diamètre des capillaires. Dans nos simulations, nous avons imposé une vitesse d'écoulement de 0,5 mm/s dans les serpentins. C'est une valeur qui se rapproche de la vitesse d'écoulement du sang dans les capillaires sanguins[26–28]. Or, le diamètre de ces derniers est largement inférieur à celui de nos serpentins. Donc, à vitesse d'écoulement égale, la contrainte de cisaillement dans les serpentins (très larges) est beaucoup plus faible que dans les capillaires sanguins (très petits).

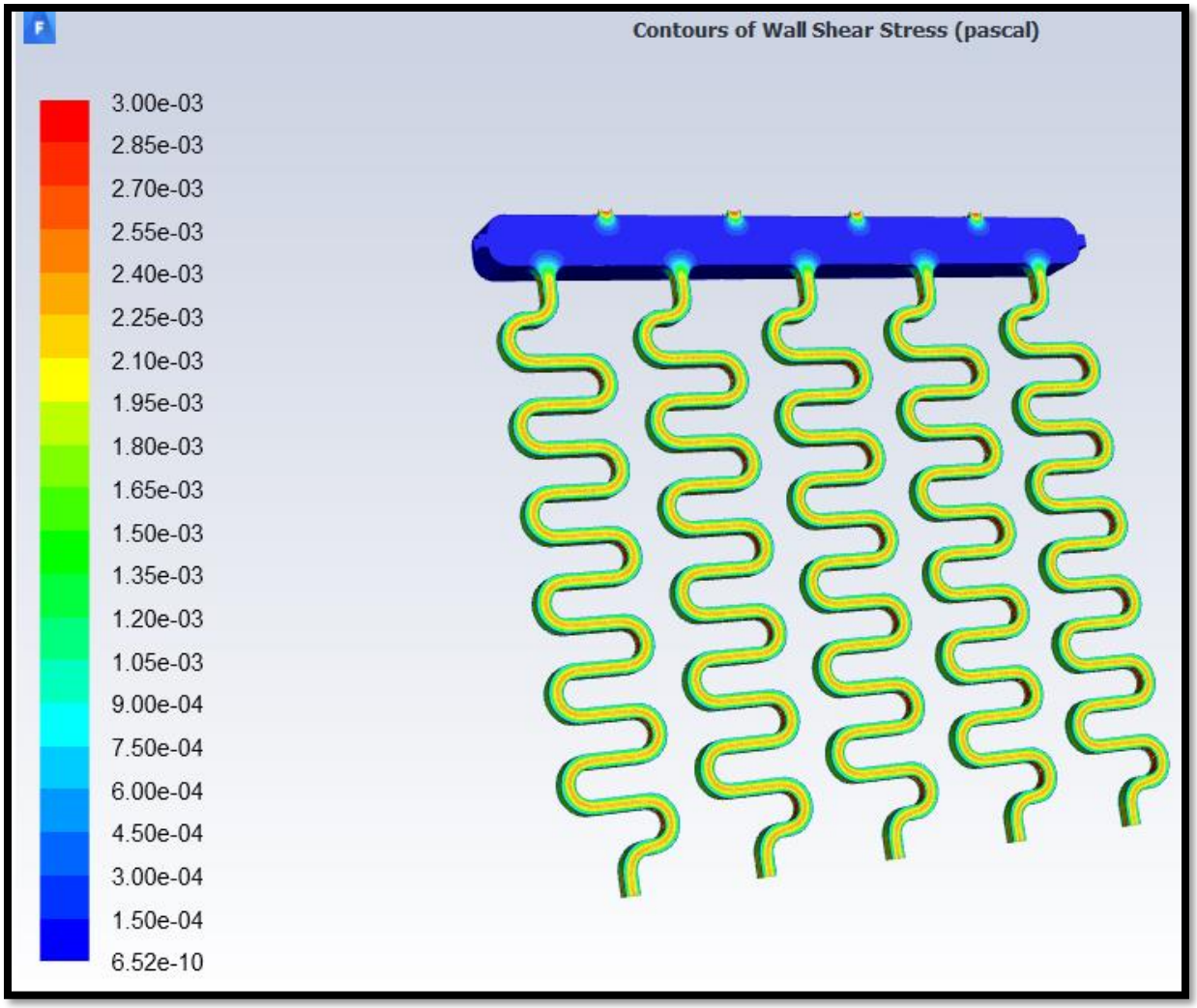


Figure 5.67. Evaluation de la contrainte de cisaillement dans le système à cinq serpentins. Les conditions appliquées pour cette simulation sont celles décrites pour la simulation 3 dans le système 6E5S.

II.2.4. Perspectives d'amélioration

Lorsque nous avons imaginé nos premiers systèmes, nous étions déjà conscients de certains de ces problèmes de design. Néanmoins, nous avons fait le choix de « défricher le terrain » en concevant d'abord des dispositifs à échelle macroscopique. Ainsi et pour dépasser les limites évoquées plus haut, l'une des possibilités serait de réduire les dimensions du système à cinq serpentins. Cela pourrait avoir plusieurs avantages :

- ✓ Se rapprocher des dimensions physiologiques des capillaires ;
- ✓ Se rapprocher des valeurs physiologiques de la contrainte de cisaillement ;

- ✓ Pouvoir rallonger le « trajet vasculaire » tout en gardant une taille totale raisonnable (de l'ordre de 1 à 10 cm) pour les systèmes fabriqués.

Il s'agit d'une perspective de développement qui commence à être explorée au sein de notre équipe par les doctorants ayant pris la suite de ce projet de thèse. Des premiers systèmes miniaturisés ont été fabriqués et sont actuellement en phase de tests.

II.3. Les limites associées à la fabrication et à la manipulation des systèmes microfluidiques

Nous allons maintenant exposer certains des problèmes « techniques » auxquels nous avons été confrontés dans le cadre de ce chapitre dédié à la microfluidique. Ces problèmes expliquent en grande partie les échecs que nous avons essuyés tant sur le système mono-serpentin que sur la validation des systèmes à cinq serpentins.

Les difficultés rencontrées étaient multiples. Nous allons les citer ici une par une pour pouvoir les individualiser et les discuter. Cependant, il est à noter qu'au cours d'une manipulation plusieurs de ces problèmes se manifestaient souvent en même temps.

II.3.1. Les fuites entre le système et son couvercle

- ➢ **Description**

Il s'agit d'un problème d'étanchéité caractérisé par la progression du fluide entre la surface supérieure du système et la surface inférieure du couvercle (alors qu'il doit progresser uniquement à l'intérieur des canaux). Souvent, un épanchement de liquide se formait entre les 2 couches de PDMS. Dans le cas du système à cinq serpentins, des solutions issues de plusieurs serpentins finissaient par se mélanger.

- ➢ **Origine**

Ce problème est dû à un collage imparfait entre le système et son couvercle suite à l'activation des 2 surfaces de PDMS par plasma. En effet, cette opération peut être affectée par de nombreux paramètres (humidité ambiante, adsorption de poussières …).

- ➢ **Solutions tentées**

Pour pallier ce problème nous avons mis en place un certain nombre de mesures :

- ✓ La fabrication (et notamment le scellement) des systèmes s'effectuaient en salle blanche ;

- ✓ Les surfaces étaient décontaminées au ruban adhésif avant l'activation au four à plasma ;
- ✓ Les 2 surfaces, après les avoir appliquées l'une sur l'autre, étaient rapidement incluses dans un « étau » en plexiglas. Il s'agit de 2 plaques de plexiglas entre lesquelles l'ensemble (système + couvercle) était pris en sandwich. Des trous dans les plaques permettaient ensuite d'insérer des vis pour maintenir le système sous pression. Le but étant de maintenir le contact entre les 2 surfaces de PDMS en leur appliquant une pression homogène. Cette solution présente néanmoins l'inconvénient de rallonger le process de fabrication.

II.3.2. Les fuites aux points d'insertion des aiguilles d'entrée et de sorties

- ➢ **Description et origine**

Il s'agit d'un autre problème de fuite où le liquide s'échappait à proximité des aiguilles d'entrée et/ou de sorti. C'était très probablement dû à des fissures apparaissant au moment de créer les trous dans le PDMS pour introduire les aiguilles.

- ➢ **Solution envisagée**

Pour essayer de résoudre ce problème nous avons imaginé une approche basée sur des « joints de PDMS ». Un mélange (prépolymère + agent réticulant, ratio 10 : 1 en masse) était préparé et maintenu au réfrigérateur pendant 24 heures (ou moins de temps à température ambiante). Lorsque le mélange devenait suffisamment visqueux, il était appliqué au tour des points d'insertion des aiguilles. Les systèmes étaient ensuite chauffés (90°C, 30 minutes) pour finir de réticuler les joints obtenus.

Cette solution présente néanmoins plusieurs inconvénients :

- ✓ Le délai de fabrication était rallongé ;
- ✓ Le PDMS « semi-réticulé » était être difficile à manipuler en raison de sa consistance ;
- ✓ Cette solution ne s'appliquait pas aux systèmes mono-serpentins contenant des tumeurs. Ces derniers devaient en effet être mis sous perfusion le plus rapidement possible après l'introduction des tumeurs bio-imprimées.

II.3.3. Les autres anomalies de progression du fluide dans les systèmes (sans relation avec des fuites)

- **Description des problèmes :**

Il s'agit des problèmes majeurs qui ont fortement entravé le bon déroulement des manipulations de validation des systèmes à cinq serpentins. Ils se sont aussi avérés très difficiles à comprendre et donc à résoudre. Nous pouvons les décrire comme suit :

La progression non homogène du fluide dans les différents serpentins

Après pénétration par les entrées, le fluide progressait de manière différente dans les serpentins. Le flux pouvait circuler très rapidement dans certains serpentins et très lentement dans d'autres. Très souvent, le fluide ne circulait pas du tout sur 1 à 2 serpentins sans qu'on puisse visualiser un obstacle « physique » s'opposant à sa progression (bulle d'air, fragment de PDMS). C'est d'ailleurs souvent pour ça que les expériences de validation quantitative n'ont pas pu être menées à terme.

La difficulté de cette situation tenait au fait qu'il n'y avait pas un « scenario de prédilection » qui se dessinait au fur et à mesure de la répétition des expériences. Autrement dit, il nous a été impossible d'identifier des serpentins où la progression du liquide semblait toujours entravée ou au contraire toujours favorisée.

Les phénomènes de « rétro-flux » et de vidange

Dans ces situations, le fluide, dans un serpentin donné, se mettait soudainement à progresser dans la direction (sortie-entrée) (dans le sens contraire du flux imposé par le pousse-seringue). Le fluide remontait le serpentin puis repassait très rapidement par un autre serpentin en drainant son contenu. Ce sont des phénomènes aussi soudains que rapides. Par ailleurs, ils entrainaient le mélange du contenu des serpentin ce qui éloignait les concentrations de celles prédites par les simulations.

Les bulles d'air

Les bulles d'air sont connues pour être un souci majeur en microfluidique. Aussi, nous avons essayé de prendre des précautions pour minimiser leur présence dans les solutions de perfusion. Cependant, elles ont quand même constitué un problème non négligeable car elles apparaissaient de manière souvent imprévisible au cours des essais de perfusion et

contribuaient à perturber l'écoulement des fluides dans les serpentins. Elles pouvaient apparaitre à plusieurs niveaux :

- ✓ Au voisinage des entrées : Elles pouvaient alors soit provenir des tuyaux de connexion ou apparaitre sur place ;
- ✓ Dans le mélangeur : Dans certaines situations, on a observé la formation rapide de bulles d'air volumineuses qui chassaient le liquide présent dans le mélangeur ;
- ✓ Dans les serpentins : Il pouvait s'agir soit de petites bulles qui apparaissaient et se maintenaient ou de bulles volumineuses (ou poches d'air) qui remplaçaient le liquide dans le serpentin concerné.

- ➢ **Les solutions envisagées**

Au fur et à mesure de la progression des expérimentations, nous avons émis plusieurs hypothèses pour essayer de comprendre et de résoudre cet ensemble de problèmes. Nous évoquons ici certaines de nos tentatives :

Refaire des simulations pour détecter d'éventuels écarts de pression statique entre les serpentins :

Nous avons émis l'hypothèse que des écarts de pression entre les serpentins pouvaient être à l'origine de la distribution non homogène du fluide dans le système. Des simulations ont donc été réalisées par visualiser l'évolution de la pression dans chacun des serpentins. Les résultats obtenus suite à ces simulations sont illustrés par la Figure 5.68 ci-dessous.

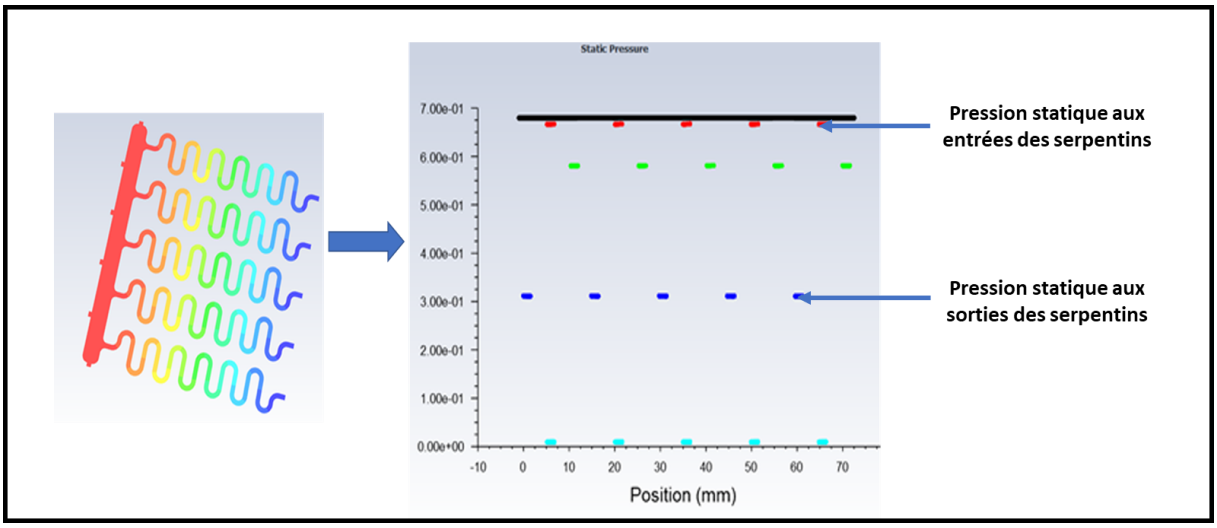


Figure 5.68. Simulation des valeurs de la pression statique à différents niveaux des serpentins. Les conditions appliquées sont celles de la simulation 3 avec le système 6E5S.

En observant la Figure 5.68, on voit que la valeur de la pression statique diminue à la sortie des serpentins par rapport à l'entrée (perte de charge associée à la progression du fluide dans les canaux). Cependant, la valeur de la pression statique sur une ligne horizontale parcourant tous les serpentins est constante. Donc, cette simulation n'a pas permis de confirmer l'hypothèse initiale. Selon les simulations, la pression statique évolue de manière homogène entre les serpentins et ne semble donc pas être à l'origine de la réparation aléatoire du fluide dans le système.

Améliorer la qualité de la surface des moules

Les moules utilisés pour la fabrication des systèmes sont imprimés en 3D par extrusion de filaments fondus de matériaux. Les surfaces des moules obtenus présentent des stries qui se retrouvent sur le système en PDMS après son démoulage. Ceci est illustré par la Figure 5.69.

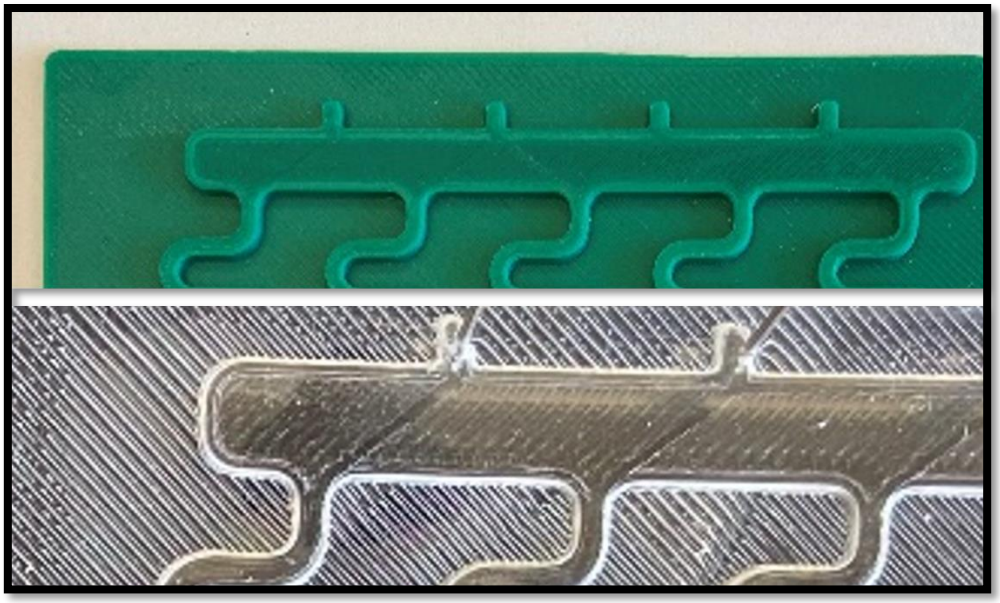


Figure 5.69. Imperfections sur le moule qui se retrouvent sur le système en PDMS.

Nous avons émis l'hypothèse que les stries à la surface des canaux pouvaient avoir un impact sur la progression du fluide dans les serpentins.

Avec nos collaborateurs à l'Institut Jean Lamour, nous avons tenté un traitement chimique des moules pour lisser leurs surfaces. Les nouveaux moules obtenus suite à ces traitements présentaient une surface beaucoup moins rugueuse ce qui s'est répercuté sur les systèmes en PDMS (l'observation macroscopique permettait de constater que les canaux sur ces systèmes étaient plus lisses).

Cependant, la répartition du fluide dans ces systèmes ne semblait pas mieux se dérouler (par rapport aux anciens systèmes). Les mêmes phénomènes décrits plus haut s'étaient de nouveau manifestés.

Pour contourner ce problème associé aux moules imprimés en 3D, l'une des possibilités serait de recourir à d'autres procédés de fabrication. La miniaturisation des systèmes permettra notamment la fabrication des moules par photolithographie.

A l'issue de cette thèse, ce projet se poursuivra au sein de notre équipe. Deux doctorants ont notamment pris le relai pour étudier plus en détail les aspects relatifs à la microfluidique. Actuellement, les travaux semblent s'orienter vers des dispositifs miniaturisés où les dimensions des serpentins se rapprochent plus du diamètre des capillaires *in vivo*. Même si cette nouvelle approche a ses propres difficultés, nous espérons que le travail effectué dans

le cadre de cette thèse aidera les nouveaux doctorants à aller de l'avant pour la concrétisation de cet ambitieux projet de recherche.

III. Conclusion du 5ème chapitre

La prise en charge des conditions dynamiques est une étape essentielle en vue de créer des modèles tumoraux réalistes et prédictifs. La technologie des CoC a apporté les premières réponses à ce besoin. Néanmoins, les modèles décrits actuellement ne permettent pas de simuler le trajet vasculaire du médicament en même temps que son action sur le tissu tumoral. Or cette action peut justement être largement influencée par les phénomènes intervenant au cours de la phase vasculaire. Dans ce chapitre, nous avons essayé d'apporter une réponse à cette problématique. Nous avons imaginé un système microfluidique nous permettant d'étudier, en même temps, le transport vasculaire du médicament et son interaction avec le tissu tumoral ovarien bio-imprimé en 3D. Par la suite, nous avons conçu une version améliorée de ce système permettant de tester, en même temps, plusieurs concentrations différentes de médicament. La mise au point de ce système évolué a nécessité le recours à aux simulations numérique en mécanique des fluides. Ces simulations ont permis de mettre au point un design générant 5 concentrations différentes de médicament à partir d'une même solution initiale. En revanche, L'application expérimentale de ces systèmes a été entravée par un grand nombre de problèmes qui nous empêchent de tirer des conclusions claires par rapport à leur pertinence et leur plus-value. En effet, la mise sous perfusion des tumeurs bio-imprimées au sein du système mono-serpentin a considérablement accéléré leur fragilisation au fil du temps. Ceci a rendu très difficile l'évaluation de leur viabilité de manière fiable et reproductible. De plus, les nombreux problèmes techniques ont empêché la validation expérimentale du système à cinq serpentins. De nombreux efforts ont été déployés pour essayer de résoudre cet ensemble de problèmes mais avec des résultats très mitigés. A l'issue de cette thèse, les efforts se poursuivront en vue de développer des systèmes à échelle micrométrique qui se veulent plus biomimétiques. Nous espérons que l'expérience accumulée dans le cadre de ce projet doctoral seront utile au développement de ces nouveaux systèmes.

Références bibliographiques

1. Liu Q, Luo Q, Ju Y, Song G. Role of the mechanical microenvironment in cancer development and progression. *Cancer Biol Med*. 2020;17(2):282-292. doi:10.20892/j.issn.2095-3941.2019.0437

2. Rejniak KA. Circulating Tumor Cells: When a Solid Tumor Meets a Fluid Microenvironment. *Adv Exp Med Biol*. 2016;936:93-106. doi:10.1007/978-3-319-42023-3_5

3. Hassell BA, Goyal G, Lee E, et al. Human Organ Chip Models Recapitulate Orthotopic Lung Cancer Growth, Therapeutic Responses, and Tumor Dormancy In Vitro. *Cell Reports*. 2017;21(2):508-516. doi:10.1016/j.celrep.2017.09.043

4. Strelez C, Chilakala S, Ghaffarian K, et al. Human colorectal cancer-on-chip model to study the microenvironmental influence on early metastatic spread. *iScience*. 2021;24(5):102509. doi:10.1016/j.isci.2021.102509

5. Tse JM, Cheng G, Tyrrell JA, et al. Mechanical compression drives cancer cells toward invasive phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(3):911-916. doi:10.1073/pnas.1118910109

6. Zhou H, Wang M, Zhang Y, et al. Functions and clinical significance of mechanical tumor microenvironment: cancer cell sensing, mechanobiology and metastasis. *Cancer Commun (Lond)*. 2022;42(5):374-400. doi:10.1002/cac2.12294

7. Fleszar AJ, Walker A, Porubsky V, et al. The extracellular matrix of ovarian cortical inclusion cysts modulates invasion of fallopian tube epithelial cells. *APL Bioeng*. 2018;2(3):031902. doi:10.1063/1.5022595

8. de Almeida Monteiro Melo Ferraz M, Nagashima JB, Venzac B, Le Gac S, Songsasen N. A dog oviduct-on-a-chip model of serous tubal intraepithelial carcinoma. *Sci Rep*. 2020;10:1575. doi:10.1038/s41598-020-58507-4

9. Li SS, Ip CKM, Tang MYH, et al. Modeling Ovarian Cancer Multicellular Spheroid Behavior in a Dynamic 3D Peritoneal Microdevice. *J Vis Exp*. 2017;(120):55337. doi:10.3791/55337

10. Ibrahim LI, Hajal C, Offeddu GS, Gillrie MR, Kamm RD. Omentum-on-a-chip: A multicellular, vascularized microfluidic model of the human peritoneum for the study of ovarian cancer metastases. *Biomaterials*. 2022;288:121728. doi:10.1016/j.biomaterials.2022.121728

11. Conrad C, Moore K, Polacheck WJ, Rizvi I, Scarcelli G. Mechanical Modulation of Ovarian Cancer Tumor Nodules Under Flow. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*. 2022;69(1):294-301. doi:10.1109/TBME.2021.3092641

12. Baka Z, Stiefel M, Figarol A, et al. Cancer-on-chip technology: current applications in major cancer types, challenges and future prospects. *Prog Biomed Eng*. 2022;4(3):032001. doi:10.1088/2516-1091/ac8259

13. Trainor GL. The importance of plasma protein binding in drug discovery. *Expert Opinion on Drug Discovery*. 2007;2(1):51-64. doi:10.1517/17460441.2.1.51

14. Kopac T. Protein corona, understanding the nanoparticle–protein interactions and future perspectives: A critical review. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2021;169:290-301. doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.12.108

15. Xu W, Xu M, Xiao Y, et al. Changes in target ability of nanoparticles due to protein corona composition and disease state. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2022;17(3):401-411. doi:10.1016/j.ajps.2022.03.002

16. Jean-Marie G, Anne-Marie O. *Le préparateur en pharmacie - Guide théorique et pratique*. Vol P. 435. 2 nd. Lavoisier; 2013.

17. Klemba A, Bodnar L, Was H, et al. Hypoxia-Mediated Decrease of Ovarian Cancer Cells Reaction to Treatment: Significance for Chemo- and Immunotherapies. *Int J Mol Sci*. 2020;21(24):9492. doi:10.3390/ijms21249492

18. Hinderliter PM, Minard KR, Orr G, et al. ISDD: A computational model of particle sedimentation, diffusion and target cell dosimetry for in vitro toxicity studies. *Particle and Fibre Toxicology*. 2010;7(1):36. doi:10.1186/1743-8977-7-36

19. Eikenberry S. A tumor cord model for Doxorubicin delivery and dose optimization in solid tumors. *Theor Biol Med Model*. 2009;6:16. doi:10.1186/1742-4682-6-16

20. Lundqvist M. Tracking protein corona over time. *Nature Nanotech*. 2013;8(10):701-702. doi:10.1038/nnano.2013.196

21. Casals E, Pfaller T, Duschl A, Oostingh GJ, Puntes V. Time Evolution of the Nanoparticle Protein Corona. *ACS Nano*. 2010;4(7):3623-3632. doi:10.1021/nn901372t

22. Müller B, Lang S, Dominietto M, et al. High-resolution tomographic imaging of microvessels. In: Stock SR, ed. ; 2008:70780B. doi:10.1117/12.794157

23. Paszkowiak JJ, Dardik A. Arterial wall shear stress: observations from the bench to the bedside. *Vasc Endovascular Surg*. 2003;37(1):47-57. doi:10.1177/153857440303700107

24. Chakraborty D, Ethiraj KR, Mukherjee A. Understanding the relevance of protein corona in nanoparticle-based therapeutics and diagnostics. *RSC Adv*. 10(45):27161-27172. doi:10.1039/d0ra05241h

25. Koutsiaris AG, Tachmitzi SV, Batis N, et al. Volume flow and wall shear stress quantification in the human conjunctival capillaries and post-capillary venules in vivo. *Biorheology*. 2007;44(5-6):375-386.

26. Ivanov KP, Kalinina MK, Levkovich YuI. Blood flow velocity in capillaries of brain and muscles and its physiological significance. *Microvascular Research*. 1981;22(2):143-155. doi:10.1016/0026-2862(81)90084-4

27. Hudetz AG. Blood Flow in the Cerebral Capillary Network: A Review Emphasizing Observations with Intravital Microscopy. *Microcirculation*. 1997;4(2):233-252. doi:10.3109/10739689709146787

28. Ye F, Yin S, Li M, Li Y, Zhong J. In-vivo full-field measurement of microcirculatory blood flow velocity based on intelligent object identification. *J Biomed Opt*. 2020;25(1):016003. doi:10.1117/1.JBO.25.1.016003

Conclusion générale

La mise au point de modèles précliniques fiables est un enjeu majeur en vue d'optimiser le développement des nouveaux traitements anticancéreux. De nombreux efforts de recherche sont déployés dans ce sens. Dans ce projet, nous nous sommes intéressés au cancer ovarien qui constitue un grave problème de santé publique en raison, notamment, de son mauvais pronostic. Notre objectif était d'apporter une amélioration aux modèles précliniques existants du cancer ovarien. Pour ce faire, nous avons d'abord conduit une étude bibliographique qui nous a permis d'identifier clairement les axes de travail à adopter. A travers cette étude, nous avons constaté que les outils utilisés actuellement pour modéliser les tumeurs ovariennes *in vitro* sont essentiellement la culture cellulaire en 2D ; la technologie des sphéroïdes et celle des organoïdes. Or chacune de ces technologies présente des limites : un manque de pertinence biologique pour la culture cellulaire en 2D ; des problèmes de reproductibilité et d'applicabilité pour les sphéroïdes et des problèmes de coût et de taux de succès pour les organoïdes. Par ailleurs, nous avons constaté que la bio-impression 3D, technologie pourtant prometteuse pour créer des modèles tumoraux, n'a pas encore été appliquée au cancer ovarien.

Notre étude bibliographique a également révélé les progrès accomplis dans la prise en compte des conditions dynamique lors de la création des modèles cancéreux. Ces progrès sont notamment imputés à l'émergence de la technologie des cancers sur puce. Or, cette technologie ne permet pas à l'heure actuelle d'étudier, en même temps, le trajet vasculaire du médicament et son interaction avec le tissu cancéreux.

Suite à cette analyse, nous avons décidé, dans un premier temps, d'utiliser la bio-impression 3D pour créer un modèle reproductible et peu coûteux d'une tumeur ovarienne. Nous avons commencé par formuler une bio-encre à base d'un hydrogel de gélatine et d'alginate de sodium. La composition de cet hydrogel a été optimisée de telle sorte à permettre une bonne imprimabilité à 37°C et à une faible pression d'extrusion de 10 à 20 kPa. Des cellules cancéreuses ovariennes (SKOV-3) et des fibroblastes cancéreux (MeWo) y ont ensuite été incorporées pour fabriquer les tumeurs bio-imprimées en 3D. Ces dernières ont été soumises à de nombreuses caractérisations biologiques. Nous avons ainsi pu constater le maintien de la viabilité et de la prolifération cellulaire au sein de ces tumeurs bio-imprimées. Les cellules

cancéreuses et les fibroblastes cancéreux cohabitaient en proximité immédiate au sein de la matrice 3D tout en maintenant l'expression de leurs marqueurs phénotypiques spécifiques. Des mouvements de migration des fibroblastes vers les cellules cancéreuses ont également été observés reproduisant des comportements décrits *in vivo*. A travers cet ensemble d'observations, nous avons ainsi pu apporter la preuve de la capacité de la bio-impression 3D à créer des modèles tumoraux ovariens viables et biologiquement fonctionnels.

Par la suite, nous avons étudié le comportement de nos modèles tumoraux bio-imprimés vis-à-vis d'un médicament commun dans le traitement du cancer de l'ovaire : le cisplatine. Nous avons constaté que les SKOV-3 et les MeWo réagissaient différemment lorsqu'elles étaient imprimées en 3D. La résistance des SKOV-3 a diminué au sein des structures bio-imprimées là où celle des MeWo a, au contraire, augmenté. La présence des MeWo a également contribué à renforcer la résistance des SKOV-3 au cisplatine dans les tumeurs bio-imprimées. Il s'agit d'un phénomène de synergie que nous n'avons, par ailleurs, pas observé en 2D. Ceci semble indiquer que l'environnement tridimensionnel favorise les interactions entre les cellules cancéreuses et les cellules stromales. Bien entendu, il ne s'agissait là que de conclusions préliminaires qui devront encore être confirmées par d'autres études.

Après avoir établi et caractérisé ce modèle tridimensionnel d'une tumeur ovarienne, nous avons souhaité l'intégrer au sein d'un support microfluidique. Cette combinaison de la bio-impression 3D et de la microfluidique visait à concevoir un outil permettant d'étudier le trajet vasculaire du médicament et son interaction avec le tissu tumoral. Pour ce faire, nous avons imaginé un système comprenant un canal en serpentin et une chambre de culture où le tissu tumoral bio-imprimé a été installé et perfusé sous flux physiologique pendant 48 heures. Nous avons alors constaté que la mise sous flux accélérait la dégradation de ce tissu bio-imprimé rendant très difficile la mesure de sa viabilité après perfusion.

Dans le cadre du volet microfluidique, nous avons aussi fait appel à la simulation en mécanique des fluides. Le but était de concevoir un système permettant de teste, en même temps, plusieurs concentrations de médicament générées à partir d'une seule solution initiale. SI les simulations ont permis de concevoir un design théorique répondant à cet objectif, les problèmes techniques ont malheureusement empêché sa validation expérimentale avant la fin du temps imparti pour cette thèse.

Pour résumer, on peut dire que la bio-impression 3D a été utilisée avec succès pour créer un modèle tumoral ovarien viable et biologiquement fonctionnel. Cependant, la combinaison de la bio-impression 3D avec la microfluidique fut malheureusement un échec. Un échec qu'on espère cependant instructif pour les prochaines phases de ce projet.

Perspectives de recherche

Le développement des nouveaux modèles tumoraux basés sur la culture cellulaire en 3D et la microfluidique est un axe de travail de plus en plus emprunté par les chercheurs. Cependant, cette thématique n'avait jamais été explorée par notre équipe (ou notre laboratoire) avant octobre 2019. Ce projet de thèse est en réalité le premier, au sein de l'Institut Jean Lamour, à porter sur une telle thématique. Ceci explique d'ailleurs en partie l'ensemble des problèmes et difficultés auxquels nous avons été confrontés. En dépit de cela, quelques résultats ont quand même été produits à l'issue de cette thèse et un savoir-faire a été développé au sein de notre équipe. Ce travail a par ailleurs soulevé de nombreuses questions qui sont autant de perspectives de recherche pour l'avenir.

Dans ce manuscrit, nous avons fait le choix de détailler les perspectives associées à chaque chapitre directement à la fin de ce dernier. Ici, nous allons rependre ces perspectives de manière plus synthétique. Nous évoquerons également d'autres axes de recherche envisageable à plus long terme.

1. Par rapport au modèle tumoral ovarien bio-imprimé en 3D

C'est ce dont nous avons parlé dans le 3ème chapitre de ce manuscrit. C'est vraisemblablement le chapitre sur lequel nous avons eu le plus de résultats positifs. Nous y avons décrit un modèle d'une tumeur ovarienne bio-imprimée en 3D. Ce modèle présente plusieurs possibilités d'amélioration qui peuvent être explorées à l'avenir. De plus, les caractérisations effectuées nous ont amenés à nous poser plusieurs questions. Celles-ci mériteraient d'être creusées afin de mieux comprendre le fonctionnement des tumeurs bio-imprimées.

A partir de là, nous pouvons donc identifier plusieurs perspectives de recherche en les classant en deux grandes catégories : (i) les axes d'amélioration du modèle et les (ii) les questions relatives à son fonctionnement :

1.1. Les axes d'amélioration

Notre modèle tumoral bio-imprimé peut être amélioré de plusieurs manières :

- ✓ Repenser la formulation de la bio-encre pour améliorer la durabilité du modèle dans le temps tout en augmentant la densité cellulaire au sein de la matrice ;

- ✓ Introduire d'autres éléments du TME dans le modèle (cellules immunitaires ; cellules endothéliales etc.).

1.2. Les questions à explorer

- ✓ Etudier plus en détail les interactions entre les cellules cancéreuses et les fibroblastes au sein des structures bio-imprimées. Ceci permettrait notamment de confirmer et de mieux comprendre les phénomènes de migration cellulaire observés par imagerie en temps réel. On peut notamment envisager d'identifier et de quantifier les cytokines secrétées par les fibroblastes en présence des cellules cancéreuses afin d'élucider les voies de signalisations impliquées dans ces interactions. Une autre possibilité serait d'utiliser les techniques de biologie moléculaire (transcriptomique notamment) pour mieux cerner les interactions entre ces deux acteurs cellulaires ;
- ✓ Etudier les interactions entre les cellules et la matrice (gélatine – alginate) : D'après nos observations, les structures bio-imprimées contenant des cellules se dégradent beaucoup plus rapidement que celles qui n'en contiennent pas. On peut donc supposer que les cellules jouent un rôle dans la dégradation de la matrice. Une étude plus approfondie de ce phénomène permettrait de mieux comprendre les mécanismes de cette dégradation. Il s'agit aussi de déterminer si les cellules ont la capacité de synthétiser leur propre matrice extracellulaire. Une comparaison de la cinétique de dégradation et de la cinétique de néosynthèse peut également être envisagée. Ces renseignements serviraient notamment à l'amélioration de la durabilité dans le temps du modèle bio-imprimé ;

A plus long terme, on peut envisager de préparer des modèles tumoraux bio-imprimés en utilisant des cellules de patients. Si la prédictivité de tels modèles est démontrée, ils pourraient constituer un outil très intéressant notamment dans le cadre de la médecine de précision.

2. Par rapport à la réponse du modèle bio-imprimé au cisplatine

Dans le 4ème chapitre, nous avons étudié le comportement du modèle tumoral bio-imprimé vis-à-vis du cisplatine. Nos conclusions dans le cadre de cette étude sont encore très préliminaires et doivent être consolidées et confirmées. De nombreux points peuvent encore être explorés en complément du travail effectué :

- ✓ Faire des caractérisations supplémentaires pour mieux mettre en évidence la réponse des structures bio-imprimées au cisplatine : Dans notre étude, seule la technique WST-1 avait été appliquée. Des explorations supplémentaires peuvent être effectuées. Une approche par cytométrie en flux avec marquage différent des cellules vivantes et mortes peut notamment être tentée. Elle permettrait de consolider les résultats obtenus par la technique WST-1. Les réponses au cisplatine pourraient également être étudiées via des marquages immunologiques (caspase 3 clivée ; Ki-67 etc.). De plus, les techniques de biologie moléculaire seraient, là encore, d'un grand intérêt. Elles permettraient de déterminer les modifications d'ordre génétiques entrainées par l'exposition au cisplatine en 2D et en 3D. Le but étant de mieux mettre en évidence l'impact de l'environnement tridimensionnel sur les réponses aux xénobiotiques ;
- ✓ Etendre l'étude à d'autres molécules : Il serait intéressant d'évaluer la réponse des structures bio-imprimés à d'autres molécules utilisées dans le traitement du cancer ovarien. Le but est double : D'abord, cela permettrait de donner une preuve de concept plus solide par rapport à ce modèle tumoral. Ensuite, une telle étude pourrait mettre en évidence un pattern commun dans la réponse de ces tumeurs bio-imprimées à différents médicaments anticancéreux.

A plus long terme, l'étude de la plus-value des tumeurs bio-imprimées doit passer par la comparaison avec d'autres modèles et notamment des modèles *in vivo* ou *ex vivo*. Ce sont certes des études longues et complexes à mettre en place mais elles constituent selon nous le meilleur moyen de démontrer la plus-value et la pertinence des modèles tumoraux bio-imprimés en 3D.

3. Par rapport à l'intégration des modèles bio-imprimés au sein de supports microfluidiques

C'est ce dont nous avons parlé dans le 5ème chapitre de ce manuscrit. Comme nous l'avons vu, nos manipulations dans le cadre de ce chapitre ont donné très peu de résultats concluants. Cependant, le champ des possibles reste très large et certains axes de travail restent à explorer :

- ✓ Modifier la formulation de la bio-encre pour permettre aux structures bio-imprimées de mieux résister au flux ;

- ✓ Penser à améliorer les procédés de fabrication des systèmes microfluidiques pour réduire les problèmes de fuites et améliorer la reproductibilité des manipulations ;
- ✓ Créer un système permettant un scellement réversible des chambres de culture. Ceci permettrait d'y accéder plus facilement afin d'introduire et de récupérer les structures bio-imprimées.

A plus long terme, la miniaturisation des systèmes microfluidiques permettait d'améliorer leur niveau de biomimétisme. Bien entendu, il faudrait alors repenser le modèle tumoral 3D pour qu'il soit compatible avec ces systèmes miniaturisés.

Un autre axe d'amélioration serait d'introduire des éléments vasculaires dans les canaux des systèmes microfluidiques. Le but étant de recréer le trajet vasculaire avec les acteurs cellulaires qui y interviennent. Autrement dit, le but est de créer un véritable vaisseau dans lequel cheminerait le médicament avant d'interagir avec le tissu tumoral.

Certains de ces axes sont d'ores et déjà explorés par les doctorants ayant pris la suite de ce projet de thèse. Nous espérons que le travail de notre équipe aboutira à des modèles tumoraux pertinents et fiables qui amélioreront le processus de développement des traitements anticancéreux.

Résumé

Le cancer de l'ovaire constitue un véritable enjeu de santé public. Les nouveaux traitements se heurtent par ailleurs à des taux d'échec très élevés. Ceci s'explique notamment pour le manque de fiabilité des modèles précliniques classiques tels que la culture cellulaire en 2D. De nouveaux outils basés sur la culture cellulaire en 3D ont alors fait leur apparition tels que les sphéroïdes et les organoïdes. Or ces modèles ont leurs propres limites (coûts, difficultés d'application). La bio-impression 3D est une nouvelle approche permettant de créer des modèles tumoraux de manière contrôlée et reproductible. Néanmoins, elle a encore très peu été appliquée au cancer ovarien.

En plus de la troisième dimension, il est important de prendre en compte les conditions dynamiques associées à l'environnement tumoral. Ceci est possible depuis quelques années grâce à la technologie des cancers sur puce basée sur la microfluidique. Cependant, cette technologie ne permet pas, à l'heure actuelle, de simuler le trajet vasculaire du médicament en amont de son interaction avec le tissu tumoral.

Dans ce projet de thèse, nous avons souhaité créer un modèle tridimensionnel et dynamique du cancer ovarien en combinant les approches de bio-impression 3D et de microfluidique.

Dans un premier temps, la bio-impression 3D a été utilisée pour créer la structure tumorale à proprement parlé. Pour y parvenir, nous avons formulé un hydrogel de gélatine et d'alginate de sodium dans lequel nous avons intégré des cellules cancéreuses ovariennes (SKOV-3) et des fibroblastes cancéreux (MeWo). Le tissu tumoral bio-imprimé a ensuite été caractérisé par différentes techniques pour démontrer sa viabilité et sa pertinence biologique. Sa réponse au cisplatine a également été évaluée.

Dans un second temps, nous avons intégré le modèle tumoral bio-imprimé au sein d'un support microfluidique. Le rôle de ce support était de permettre la mise en culture du tissu bio-imprimé sous flux physiologique. Il devait également permettre de simuler le trajet vasculaire du médicament avant son interaction avec le tissu tumoral. Par la suite, nous avons fait appel à la simulation en mécanique des fluides pour concevoir une version améliorée du premier système. L'objectif étant de pouvoir tester, en même temps, plusieurs concentrations différentes de médicament sur un même dispositif microfluidique.

Ce projet de thèse a démontré la capacité de la bio-impression 3D à créer des tissus tumoraux ovariens viables et fonctionnels. Il a par ailleurs ouvert des perspectives de recherche très intéressantes par rapport aux possibilités de combiner la bio-impression 3D et de la microfluidique en vue d'améliorer la modélisation préclinique des cancers ovariens.

Mots clés

Cancer ovarien ; Bio-impression 3D ; Modèles tumoraux précliniques ; Cancers sur puce ; Microfluidique.

Summary

Ovarian cancer is a major public health issue. Moreover, new treatments still face very high failure rates. This is mainly due to the unreliability of conventional preclinical models such as 2D cell culture. Thus, new tools based on 3D cell culture have emerged such as spheroids and organoids. However, these models have their own limitations (cost, difficulty of application). 3D bioprinting is a new approach to create tunable and reproducible tumor models. However, very few bioprinted tumor models have been reported so far.

Besides the “third dimension”, it is important to consider the dynamic conditions of the tumor environment. This has been possible for some years now thanks to microfluidics-based cancer-on-a-chip technology. However, this technology currently does not simulate the drug vascular transport before its interaction with the tumor cells.

In this PhD project, we set out to create a dynamic, three-dimensional model of ovarian cancer by combining 3D bioprinting and microfluidics.

First, 3D bioprinting was used to create the tumor structure itself. For that, we formulated a bio-ink comprising SKOV-3 ovarian cancer cells and MeWo cancer fibroblasts embedded in a gelatin – alginate hydrogel. The bioprinted tumor structures were then characterized by various techniques to demonstrate their viability and biological relevance. their response to anticancer drug cisplatin was also assessed.

In the second step, we integrated the bioprinted tumor model into a microfluidic support for culture under physiological flow. This support was also intended to simulate the drug's vascular transport prior to interaction with the tumor tissue. We then used computational fluid dynamics to design an improved version of the first system. The aim of this improved version was to simultaneously assess multiple drug concentrations.

This PhD project demonstrated the ability of 3D bioprinting to create viable and functional ovarian tumor models. It has also brought interesting research prospects with regard to the possibilities of combining 3D bioprinting and microfluidics to improve preclinical modeling of ovarian tumors.

Key words

Ovarian cancer; 3D bioprinting; preclinical tumor models; Cancer-On-Chip; Microfluidics.