

Table des matières

Table des illustrations.....	3
Table des abréviations.....	5
1. Introduction.....	6
1.1. But du travail.....	6
1.2. Les barrières biologiques	7
1.2.1. La barrière hémato-encéphalique (BHE).....	7
1.2.2. La barrière rénale	8
1.3. La bioimpédance	10
1.4. La fluidique dans les modèles <i>in vitro</i>	11
1.5. Quelques modèles <i>in vitro</i> de barrières intégrant la fluidique le TEER	14
1.5.1. Modèles de barrière hémato-encéphalique (BHE)	14
1.5.2. Modèles de barrière rénale.....	17
2. Matériels et méthodes	20
2.1. Culture cellulaire.....	20
2.1.1. Comptage des cellules.....	20
2.1.2. Cellules MPK (Mouse Kidney Cortical Collecting Tube).....	20
2.1.3. Ensemencement des cellules	20
2.2. Test de viabilité	20
2.3. Immuno-marquage membranaire des jonctions serrées ZO-1.....	21
2.4. Test de perméabilité	21
2.5. Test de biocompatibilité	21
2.6. Test de toxicité.....	22
2.7. Mesure du TEER	22
2.8. Utilisation et contrôle des systèmes de fluidique.....	23
2.9. Cellware Hepia	24
3. Résultats	26
3.1. Caractérisation des cellules MPK.....	26
3.2. Fluidique dans la chambre supérieure.....	32
3.3. Fluidique dans la chambre inférieure	34
3.4. Validation du Cellware Hepia.....	36
3.5. Validation de Cellware Hepia avec fluidique	43
3.6. Test de toxicité <i>in vitro</i>	45
4. Discussion	48
4.1. Caractérisation des cellules MPK.....	48

4.2.	Fluidique	49
4.3.	Validation du Cellware Hepia.....	50
4.4.	Validation de Cellware Hepia avec fluide	51
4.5.	Test de toxicité <i>in vitro</i>	52
5.	Conclusion et perspectives.....	53
6.	Remerciement	54
7.	Bibliographie.....	55
8.	Annexes	59
8.1.	Matériel et protocole du comptage de cellules.....	59
8.2.	Lignée cellulaire Cellule MPK	59
8.3.	Matériel et protocole pour la préparation du tampon Ringer HEPES	61
8.4.	Protocole de test de perméabilité par transport de Lucifer Yellow	61
8.5.	Feuille Excel pour le calcul des coefficients de perméabilité	65
8.6.	Matériels et protocole d'immuno marquage (un tampon seulement)	66
8.7.	Protocole de test de viabilité PI/Calcein/Hoechst	67
8.8.	Imageries des cellules MPK.....	68
8.9.	Imageries des appareils développés en laboratoire	69
8.10.	Interface de contrôle et résultats des mesures de TEER avec le programme CellZscope	73
8.11.	Impédancemètre complet (Cellware + Hardware)	74

Rapport-gratuit.com 
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

Table des illustrations

Figure 1 Quelques barrières biologiques du corps humain	7
Figure 2 La barrière hémato-encéphalique (BHE).....	8
Figure 3 La barrière rénale	9
Figure 4 Schéma présentant la configuration des cellules épithéliales (MPK) in vivo	9
Figure 5 Diagramme présentant la contribution trans- et paracellulaire à l'impédance totale, Z, de la cellule.	10
Figure 6 Représentation schématique des systèmes de coculture statiques et dynamiques.	12
Figure 7 Installation complète d'un instrument prototype H μ REL [®]	13
Figure 8 Le modèle HuMiX	14
Figure 9 Structure et conception du μ BBB.....	15
Figure 10 Modèle SyM-BBB.....	15
Figure 11 Schéma du projet Transwell-BB	16
Figure 12 Coloration par fluorescence des cellules BMECs	17
Figure 13 Bioréacteur à perfusion microfluidique	18
Figure 14 Photo du système de perfusion et les détails du bioréacteur microfluidique foie-rein	18
Figure 15 Le microdispositif rénale bio-inspirée.	19
Figure 16 Schéma des composants utiles à la mesure du TEER.....	22
Figure 17 Imagerie des différents systèmes de mesure de l'impédance.....	23
Figure 18 Imagerie des systèmes de microfluidique.....	23
Figure 19 Interface de l'application PMI permettant le contrôle des pompes péristaltiques	24
Figure 20 Eclatée de vue du Cellware Hepia intégrant de la fluidique	24
Figure 21 Eclatée de vue de la partie supérieure du Cellware Hepia ; 1	25
Figure 22 Monitoring avec CellZscope des cellules MPK sur une semaine	26
Figure 23 Résultats du test de perméabilité au Jaune lucifer	27
Figure 24 Immuno-marquage sur les jonctions serrées ZO-1 des cellules MPK	27
Figure 25 Monitoring entre des cellules initialementensemencées à des nombres différents.....	28
Figure 26 Monitoring sur des cellules MPKensemencées à 178'600 cellules/cm ² incubée en milieu avec et sans sérum (N=1)	29
Figure 27 Monitoring sur des cellules MPKensemencées à 178'600 cellules/cm ² incubée en milieu avec et sans sérum (N=2)	30
Figure 28 Monitoring sur des cellules MPKensemencées à 178'600 cellules/cm ² incubée en milieu avec et sans sérum (N=3)	31
Figure 29 Monitoring entre des cellulesensemencées à 178'600 cellules/cm ² sur une membrane de PET et une membrane de PC.....	32
Figure 30 Schéma de la fluidique supérieure par rapport à une culture sans fluidique	32
Figure 31 Schéma présentant la méthode de culture des inserts 1 et 2 sous condition avec ou sans fluidique.....	33
Figure 32 Images des cellules MPK durant l'expérience de fluidique supérieure	33
Figure 33 Test de viabilité sur l'insert 1.....	34
Figure 34 Test de viabilité sur l'insert 2.....	34
Figure 35 Schéma des cultures avec cellules MPKensemencées sur et sous la membrane de l'insert avec de la fluidique inférieure par rapport à des cultures sans fluidiques	34
Figure 36 Monitoring des cellules MPKensemencées sur la membrane avec le Millicell avec et sans fluidique provenant du compartiment inférieur	35
Figure 37 Monitoring des cellules MPKensemencées sous la membrane avec le Millicell avec et sans fluidique provenant du compartiment inférieur.....	35

Figure 38 Monitoring du TEER sur une semaine (N=1) sur des cellules MPK avec Cellware Hepia et CellZscope.....	36
Figure 39 Monitoring du TEER sur une semaine (N=2) sur des cellules MPK avec Cellware Hepia et CellZscope.....	37
Figure 40 Test de biocompatibilité sur les composants du Cellware Hepia.....	37
Figure 41 Test de viabilité sur les composants du Cellware Hepia	38
Figure 42 Résultats de l'incubation dans du milieu de culture de deux composants permettant la conductivité électrique	38
Figure 43 Test de l'effet de la température sur la mesure du TEER.....	39
Figure 44 Graphe d'inertie du Cellware Hepia	39
Figure 45 Graphe d'inertie du CellZscope	40
Figure 46 Schéma présentant la différence de conformation entre la distance des électrodes et la membrane de l'insert pour le CellZscope et pour le Cellware Hepia.....	40
Figure 47 Test des différentes distances entre les électrodes sur le Cellware Hepia	41
Figure 48 Schéma présentant les différentes surfaces d'électrodes testées avec le diamètre du trou et la surface effective de l'électrode inférieure.	41
Figure 49 Test des différentes tailles d'électrodes inférieures sur le Cellware Hepia	42
Figure 50 Test d'inversion des inserts entre le Cellware Hepia et le Cellware CellZscope	42
Figure 51 Schéma de l'expérience monitorée par le Cellware Hepia avec fluide.....	43
Figure 52 Monitoring du TEER sur une semaine (N=1) sur des cellules MPK en présence de fluide.....	43
Figure 53 Monitoring du TEER sur une semaine (N=2) sur des cellules MPK en présence de fluide.....	44
Figure 54 Test de viabilité sur les cellules cultivées avec le Cellware Hepia avec fluide	45
Figure 55 Test de toxicité	46
Figure 56 Graphe avec données normalisées sur le test de toxicité du mannitol	47
Figure 57 Feuille Excel ayant permis les calculs des coefficients de perméabilité	66
Figure 58 Cellules MPK à confluence	68
Figure 59 Système de fluide dans la chambre supérieure	69
Figure 60 Système de fluide dans la chambre inférieure.....	69
Figure 61 Connecteur fabriqué par Grégory Fischler permettant l'acquisition de données sur les mesures de la bioimpédance avec le Cellware hepia et le software CellZscope	70
Figure 62 Cellware Hepia (24 puits) avec mesure de la bioimpédance.	70
Figure 63 Cellware Hepia (24 puits) avec mesure de la bioimpédance et le connecteur permettant de se relier au software du système CellZscope	71
Figure 64 Cellware Hepia intégrant de la fluide.....	71
Figure 65 Système complet de monitoring du TEER intégrant de la fluide.....	72
Figure 66 Plaque de culture 24 puits imprimée en acide polylactique (PLA) avec l'imprimante 3D Ultimaker 2	72
Figure 67 Interface de contrôle des mesures du TEER.....	73
Figure 68 Interface des résultats des mesures du TEER.....	73
Figure 69 Impédancemètre complet sans fluide : Cellware Hepia et Hardware Hepia	74
Figure 70 Impédancemètre complet avec fluide et système à deux pompes péristaltiques	74

Table des abréviations

A-B :	Apical-Basolatéral
B-A :	Basolatéral-Apical
BHE :	Barrière hémato-encéphalique (Blood-Brain Barrier)
C _{Cl} :	Capacité de la couche cellulaire
C _{EI} :	Capacité des électrodes
ECM :	ExtraCellular Matrix (matrice extracellulaire)
hCMEC :	Cerebral Microvessel Endothelial Cells (cellules endothéliales de microvaisseaux cérébraux)
MCCD :	Mouse Kidney Cortical Collecting Duct
MPK :	Mouse Proximal Kidney
PBS :	Phosphate Buffered Saline (Tampon phosphate salin)
PC :	Polycarbonate
PCB :	Polychlorobiphényle
PDMS :	Polydiméthylsiloxane
PET :	Polyester
PFA :	Paraformaldéhyde
PI :	Propidium Iodide (Iodure de propidium)
R _{med} :	Résistance du milieu
R _{membrane} :	Résistance de la membrane semi-perméable
R _{tissu} :	Résistance du tissu cellulaire
TEER :	TransEndo/Epithelial Electric Resistance (résistance électrique transendo/épithéliale)
ZO-1 :	Zonula Occludens (Jonction serrée)
Wi-Fi :	Wireless Fidelity

1. Introduction

Pour l'industrie pharmaceutique, les barrières physiologiques sont très importantes. Ce sont elles qui déterminent si un médicament va être rejeté du corps, absorbé ou métabolisé. C'est pourquoi le développement de modèles de barrières *in vitro* est si important et ces barrières doivent être caractérisées au mieux possible. La science cherche à comprendre comment le passage et la sélectivité des molécules s'effectue au travers des différentes barrières biologiques afin de définir si un médicament peut avoir des répercussions ou non. Le principal objectif du développement de nouvelles entités chimiques et biologiques au sein de l'industrie pharmaceutique est de prédire comment les paramètres *in vivo* vont être assimilés à partir des essais *in vitro* de culture cellulaire et des études animales. Les essais *in vitro* sont nécessaires car *in vivo* ils demandent une isolation de la barrière biologique qui est très difficile. De plus, la reproductibilité entre différents explants d'un même patient est très basse. C'est pourquoi la nécessité de modèles *in vitro* permettant l'étude des barrières biologiques et des transports de molécules est donc devenue primordiale. Le développement de tels systèmes *in vitro* est très délicat et inclus deux tâches cruciales : l'imitation de l'environnement *in vivo* et la surveillance de l'intégrité de la barrière *in vitro*.

L'environnement cellulaire *in vivo* est compliqué à imiter du fait que le corps humain est très complexe. En effet, les interactions entre les cellules, entre les organes, la présence d'un flux continu comme le sang sont très bénéfiques pour les cellules et leur apportent certaines caractéristiques supplémentaires. Ils sont difficiles à mettre en œuvre *in vitro*. Ainsi, de grands progrès ont été accomplis dans le domaine de la microfluidique pour fournir des substituts *in vitro* qui sont conçus pour imiter l'architecture physiologique et dynamique du corps humain. De plus, ces modèles ont besoin d'être caractérisés afin d'affirmer qu'ils imitent au mieux la situation *in vivo*. Un corps humain est capable de résister à un courant électrique auquel il est soumis de différentes manières selon le type de tissu en présence.

L'une de ces caractéristiques essentielles est l'intégrité de la barrière qui peut être déterminée par des mesures d'impédance. Chaque barrière présente dans le corps humain possède une impédance. La mesure de l'impédance permet non seulement d'indiquer l'intégrité de la barrière, mais également de révéler l'état de santé des cellules qui la compose. Dans ce travail, le développement et la validation d'un appareil intégrant la mesure de l'impédance d'une couche cellulaire et la fluïdique va être présenté. De plus, cet appareil permettra le monitoring de plusieurs cultures simultanément.

1.1. But du travail

La recherche dans le domaine des nouveaux médicaments et autres molécules pouvant avoir des effets bénéfiques par rapport à certaines maladies du corps humain avance à une vitesse fulgurante. C'est pour ceci que le développement de modèles *in vitro* et les moyens permettant la caractérisation de ceux-ci doivent évoluer à la même vitesse. Tout le monde n'a pas l'opportunité ou les moyens d'acheter un tel appareil permettant l'acquisition de données de par leur somme très coûteuse. Les modèles *in vitro* ne cessent d'évoluer et d'imiter au maximum le comportement *in vivo*.

Le but de ce projet est donc de mettre en avant d'une part l'importance de la fluïdique dans les modèles *in vitro* de barrières physiologiques en validant biologiquement et techniquement un impédancemètre intégrant de la fluïdique et pouvant mesurer jusqu'à 24 puits. Cet impédancemètre serait à la portée de la plupart des chercheurs et permettrait de caractériser tous les modèles *in vitro* en termes d'impédance. Celui-ci cumulerait les avantages de plusieurs appareils servant à mesurer l'impédance. De plus, une application possible de cet impédancemètre peut être montrée durant ce projet.

1.2. Les barrières biologiques

L'être humain est protégé par différentes barrières biologiques. Les agents externes se heurtent à des obstacles extrêmement sélectifs et très robustes. Les barrières qui protègent l'intérieur du corps humain contre l'extérieur de celui-ci sont dites physiques, comme la peau et les muqueuses (Figure 1).

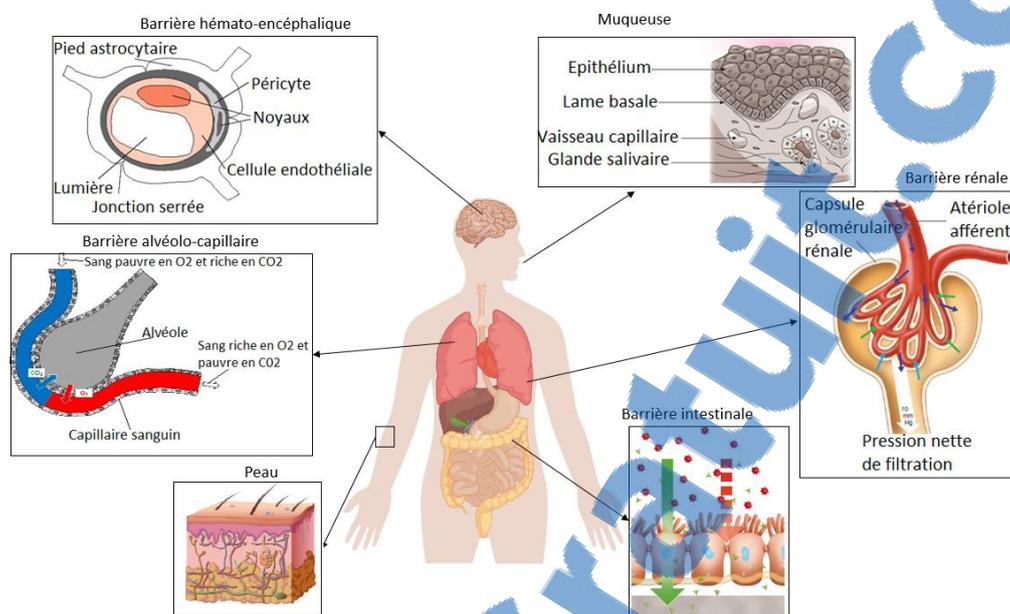


Figure 1 Quelques barrières biologiques du corps humain [1]

Les barrières biologiques étant cachées dans le corps humain sont par exemple, la barrière hémato-encéphalique ou encore la barrière rénale (Figure 1) en sont des exemples. Ces barrières sont principalement des couches cellulaires unistratifiées ou pluristratifiées séparant le sang d'autres compartiments et sont suivant l'emplacement dans le corps humains composés principalement de cellules épithéliales ou de cellules endothéliales.

Les cellules épithéliales sont des cellules formant les différents épithéliums. Il s'agit de tissus organiques dit de revêtement puisqu'ils recouvrent la surface interne ou externe des divers organes. Les cellules endothéliales sont les cellules qui tapissent l'intérieur des vaisseaux sanguins et sont de ce fait en contact direct avec le sang. Ces cellules permettent de laisser passer des petites molécules comme les nutriments pour alimenter les cellules comme dans les reins où la lame basale est dite fenestrée qui permet le passage non spécifique de molécules.

1.2.1. La barrière hémato-encéphalique (BHE)

La barrière hémato-encéphalique est présente dans le cerveau chez tous les vertébrés terrestres. Elle est située à toutes les interfaces séparant la circulation sanguine du tissu nerveux sauf au niveau de certaines petites zones spécialisées appelées organes circumventriculaires (glande épiphyse, glande pinéale). Cette barrière physiologique permet de filtrer et contrôler sélectivement le passage des substances sanguines et les empêche de passer librement dans le cerveau. Elle permet de réguler la composition du milieu dans le cerveau, c'est-à-dire de garder une homéostasie. La BHE (Figure 2) protège contre les agents pathogènes, les toxines ou encore certaines hormones présentes dans le sang. Les nutriments nécessaires au bon fonctionnement du cerveau seront choisis extrêmement sélectivement alors que les déchets seront éliminés. Les cellules endothéliales étant reliées par des jonctions serrées (tight junction) entre elles tapissent les capillaires sanguins et sont les composants essentiels de cette barrière. Les capillaires sanguins cérébraux contiennent des jonctions serrées dans

leur épithélium endothélial. Lorsque ces capillaires sanguins ont quitté le cerveau, les cellules endothéliales ne contiennent plus de jonctions serrées mais des jonctions communicantes (gap junction). Deux autres types de cellules s'ajoutent aux cellules endothéliales pour former la BHE et sont très importantes. Les péricytes, les astrocytes ainsi que des neurones permettent la naissance et la croissance de la barrière hémato-encéphalique. Les péricytes sont des cellules qui se trouvent au niveau de la lame basale de l'endothélium des capillaires qu'elles entourent par de longs prolongements cytoplasmiques. Même si les péricytes sont peu nombreux, ils ont une fonction de contraction et un rôle dans la régulation métabolique à travers la régulation du débit sanguin au niveau des capillaires. Il faut distinguer deux termes différents : le complexe neurovasculaire et la barrière hémato-encéphalique. La barrière hémato-encéphalique comprend les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins irriguant le cerveau, tandis qu'un complexe neurovasculaire est l'ensemble des cellules entourant la BHE comme montré à la figure 2. De nombreux transporteurs spécifiques (transport vésiculaire, transcytose à récepteurs ou transcytose par adsorption) sont présents dans la BHE. Le transport non-spécifique est du coup limité, car la BHE doit assurer à la fois la protection, le transport des aliments et de l'oxygène nécessaire au cerveau.

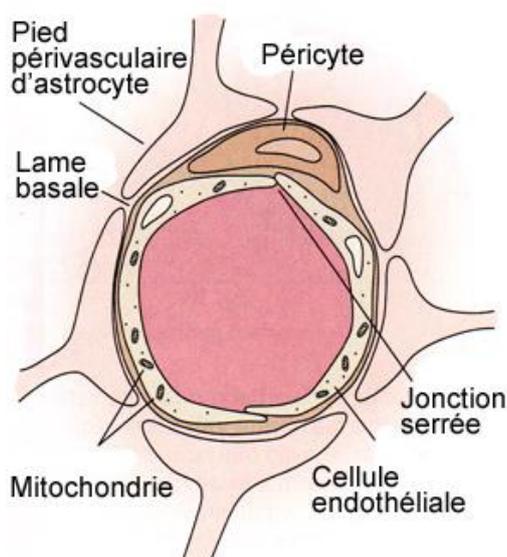


Figure 2 La barrière hémato-encéphalique (BHE). La BHE est composée de cellules endothéliales, de la lame basale, de péricytes et de pieds astrocytaires. Les jonctions serrées sont présentes entre les cellules endothéliales [2].

Il est très difficile d'obtenir des tissus cérébraux humains. Une grande variété de modèles *in vitro* de la BHE ont été développés à partir de cellules animales de rat, souris, porc ou bœuf principalement. L'utilisation de lignées endothéliales fait partie du développement de modèles *in vitro* humains de la BHE. Néanmoins, différentes lignées humaines ont été développées dont les lignées hCMEC/D3 [3], HBMEC TY08 [4] et HBMEC/ciβ [5].

1.2.2. La barrière rénale

La barrière rénale (Figure 3) comme son nom l'indique est présente dans les reins pour permettre la filtration glomérulaire. Il s'agit de la filtration du plasma sanguin au travers de la membrane basale du glomérule vers le tubule. La première étape de l'élaboration de l'urine est la formation de l'ultrafiltrat glomérulaire qui se dit aussi urine primitive, par la diffusion de l'eau et des constituants du plasma à travers la barrière rénale. La filtration s'effectue par équilibre des pressions. La pression hydrostatique glomérulaire et la pression osmotique permettent le passage du liquide plasmatique. Les éléments

figurés du sang et les protéines plasmatiques sont quant à elles retenus dû à la taille des pores et à l'électronégativité de la membrane.

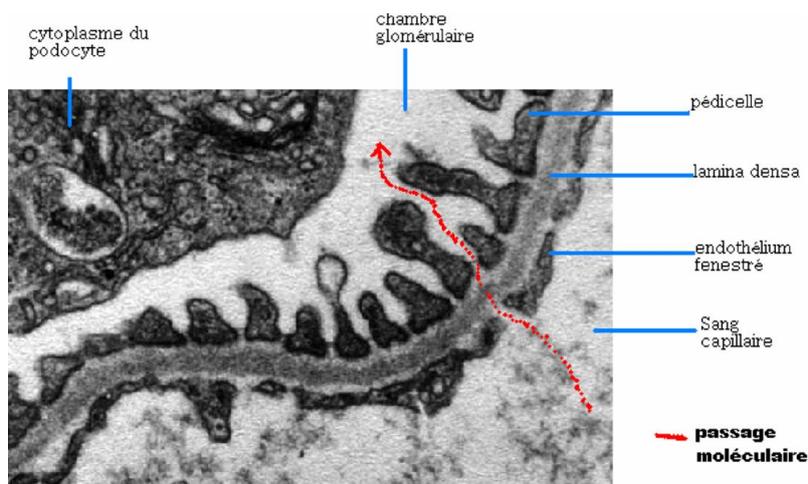


Figure 3 La barrière rénale : barrière de filtration glomérulaire avec le passage moléculaire du sang vers le glomérule [6]

Les premières lignées épithéliales et endothéliales de cellules glomérulaires ont été établies à partir de cellules de souris [7]. Les cellules MPK (MCCD, Mouse Kidney Cortical Collecting Duct) font parties des modèles utilisés. Ces cellules (Annexe 8.8) sont des cellules dérivées du tube collecteur cortical d'un rein de souris. Ce sont des cellules épithéliales adhérentes. Elles expriment de nombreuses caractéristiques du tube collecteur comme la spécificité à certains antigènes. Une fois cultivées sur des supports perméables, ces cellules présentent une résistance transépithéliale élevée avec une différence de potentiel négative. Faisant parties de la barrière rénale, les cellules MPK peuvent être un indicateur d'une toxicité liée au rein. La partie apicale des cellules se trouve être dans le tube collecteur où l'urine coule tandis que la partie basolatérale se trouve en contact avec le sang comme le montre la figure 4.

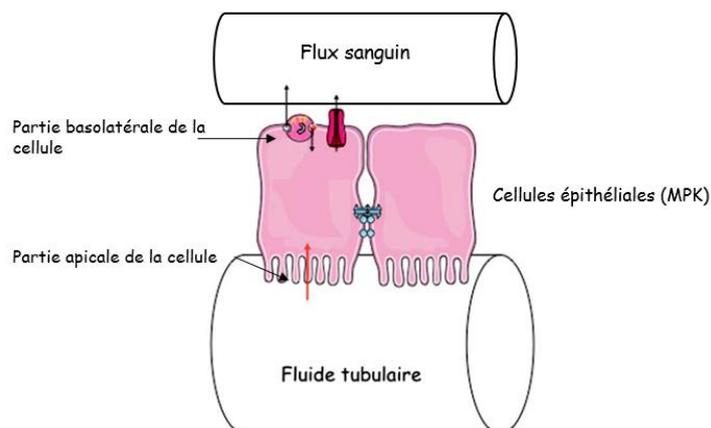


Figure 4 Schéma présentant la configuration des cellules épithéliales (MPK) in vivo [8]

Il est donc possible de tester la toxicité de médicaments en ajoutant le médicament dans la partie basolatérale représentant le compartiment sanguin. Le composé décrira une toxicité venant depuis le sang et non depuis le tube collecteur. D'autres cellules comme les cellules endothéliales glomérulaires humaines font partie des modèles très utilisés, parmi eux la lignée HK-2 [9]. Des modèles utilisant des cellules de rats, de chiens, d'opossums, de souris, de lapins, etc. ont aussi été établis.

1.3. La bioimpédance

Les modèles de barrière utilisés doivent rester intacts tout au long des expériences. Les tests d'étanchéité, de transport et de perméabilité servent à caractériser le comportement des barrières mais aussi de savoir si celles-ci sont intactes ou endommagées. Pour tester l'intégrité des barrières cellulaires, différentes méthodes existent aujourd'hui. Une d'elles est basée sur la mesure de l'impédance.

Lorsqu'un courant électrique traverse chaque corps biologique, il est possible de mesurer une résistance électrique dans chacun de ces corps via la loi d'Ohm (Equation 1).

$$U = R \cdot I$$

Équation 1 Loi d'Ohm ; U = tension électrique (différence de potentiel) [V ou volts] ; R = résistance électrique [Ω ou ohms] ; I = intensité du courant électrique [ampères ou A]

Chaque corps humain est conducteur d'électricité et est capable de résister à un courant électrique. Effectivement, lorsqu'on évoque la résistance d'un tissu biologique, le terme exact est la bioimpédance. L'impédance, Z , est basée sur trois principes : la résistance, la capacité et l'inductance. La résistance (R) est une mesure dans laquelle un élément, comme son nom l'indique, résiste au flux d'électrons ou courant électrique. Il peut résister à une solution aqueuse comme dans un tissu vivant, c'est-à-dire au flux des ions qui entre dans les cellules. Elle est exprimée en ohms (Ω).

La bioimpédance est donc la mesure de la résistance des tissus biologiques en réponse à l'envoi d'un courant. Cette mesure est effectuée à faible intensité et à fréquences variables par l'application d'une tension électrique aux bornes des électrodes. Le courant appliqué est de type sinusoïdal (alternatif). Par rapport à un courant continu, l'effet Joule (perte de chaleur et d'énergie) est moins important. Un courant alternatif est caractérisé par sa fréquence, mesurée en Hertz (Hz).

La bioimpédance est finalement une mesure de la façon dont le corps biologique empêche la circulation du courant électrique qui peut être très variable suivant l'endroit où l'on se trouve dans le corps. La bioimpédance, Z , est l'accumulation de plusieurs valeurs de capacité et de résistance. *In vitro*, elle comprend notamment la résistance du milieu R_{med} , la résistance de la membrane $R_{membrane}$, la capacité des électrodes et la capacité de la couche cellulaire présentées à la figure 5. Parmi les résistances qui forment la bioimpédance, l'une d'elles attire particulièrement l'attention. Il s'agit du TEER, soit résistance électrique transendothéliale ou transépithéliale.

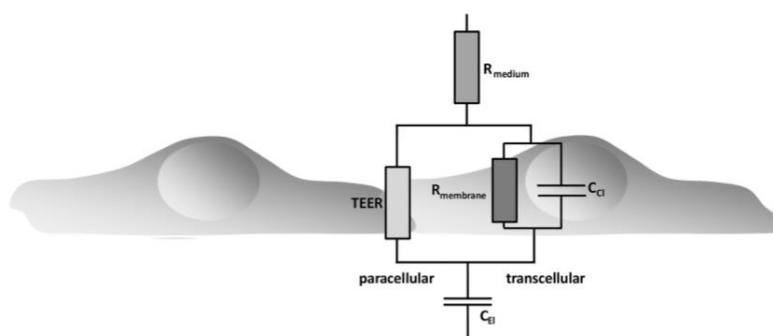


Figure 5 Diagramme présentant la contribution trans- et paracellulaire à l'impédance totale, Z , de la cellule. TEER, résistance électrique transendothéliale; C_{el} , capacité des électrodes ; C_{cl} , capacité de la couche cellulaire ; R_{med} , résistance du milieu (ohms) ; $R_{membrane}$, résistance de la membrane (ohms). [10]

Le TEER représente la résistance des jonctions serrées qui se situent entre les cellules. Un tapis cellulaire ayant une bonne intégrité aura une valeur de TEER élevée soit beaucoup de ces jonctions serrées et inversement. Les cellules commencent à faire du TEER lorsqu'elles sont à 100% de confluence, *In vitro*, de grandes valeurs de TEER sont recherchées pour démontrer que la barrière est

stable et solide. De plus, certains paramètres permettent d'augmenter la valeur de cette résistance comme la présence d'un flux. Ce point est développé ci-dessous au point 1.4.

Le TEER est mesuré au moyen d'appareil tel que le CellZscope (NanoAnalytics) ou encore le Millicell (Millipore). Une électrode de chaque côté de la couche cellulaire permet donc de mesurer la résistance de celle-ci. Toutefois, chaque appareil possède des avantages comme des inconvénients (Tableau 1).

Tableau 1 Avantages et désavantages des systèmes de mesures de la résistance transendothéliale CellZscope et Millicell

Appareil de mesure	Mode d'action	Avantages	Désavantages/ limitations
Millicell	Mesure à une fréquence donnée	<ul style="list-style-type: none"> - Prix - Mesure également la différence de potentiel - Premier instrument spécialement conçu pour effectuer des mesures du TEER - Alimentation par batterie et isolé électriquement - Compatible avec les chambres Endohm 	<ul style="list-style-type: none"> - Approximation du TEER (1 seule fréquence) - Mesure d'un seul puit - Nécessité de mesure du blanc - Lavage entre chaque mesure
CellZscope	Mesure d'impédance par spectroscopie	<ul style="list-style-type: none"> - Monitoring à long terme de 6 à 24 cultures en simultanées - Inserts standards - Mesure du TEER - Mesure de la capacitance de la couche cellulaire C_d 	<ul style="list-style-type: none"> - Prix - Nettoyage/contamination - Système immobilisé à 24 puits maximum

Un nouvel impédancemètre aimerait être produit et validé afin de réduire les désavantages et d'unir les avantages de chaque appareil. Un principal avantage supplémentaire serait le coût très accessible de l'appareil. Afin de pouvoir mettre un tel impédancemètre sur le marché, la validation d'un tel appareil doit s'effectuer autant au niveau technique (programmes, circuits électriques, montage, fuite) qu'au niveau biologique (biocompatibilité des composants, culture de cellules).

1.4. La fluidique dans les modèles *in vitro*

L'un des défis fondamentaux auxquels est confronté le développement de nouvelles entités chimiques et biologiques au sein de l'industrie pharmaceutique est de prédire comment les paramètres *in vivo* vont être assimilés à partir des essais *in vitro* de culture cellulaire et des études animales [11]. Le développement de dispositifs intégrant des cellules humaines primaires peut potentiellement fournir une meilleure prédiction, plus rapide et plus efficace de la toxicité *in vivo* et de la performance clinique des médicaments. Avec cet objectif à l'esprit, de grands progrès ont été accomplis dans le domaine de la microfluidique pour fournir *in vitro* des substituts qui sont conçus pour imiter l'architecture physiologique et dynamique du corps humain.

Pour mettre en œuvre un système microfluidique, deux composants sont cruciales, premièrement les cellules et deuxièmement l'environnement des cellules. La culture cellulaire est donc très importante pour l'étude et le développement de médicaments [12-14]. Les cellules *in vivo* sont contenues dans des microenvironnements formant le tissu [15]. Les cellules se développent à travers des interactions et de la communication avec d'autres cellules, des interactions avec la matrice extracellulaire (ECM) et des facteurs systémiques [16] *in vivo* déterminant ainsi leur phénotype. Ce sont des systèmes micrométriques complexes et bien organisées en deux dimensions ou trois dimensions selon le type cellulaire. Les microenvironnements *in vivo* de la plupart des types de cellules mammifères ont plusieurs qualités: de courtes distances entre les cellules, un approvisionnement en éléments nutritifs continu, une élimination des déchets, un maintien de température de consigne et un minimum de stress [15].

Les environnements de culture cellulaire *in vitro* ne sont pas assez élaborés pour imiter avec succès leurs homologues *in vivo* [15]. La plupart des recherches biologiques basées sur la culture de cellules

sont effectuées en isolant des cellules et en les plaçant dans un flacon de culture avec le milieu nécessaire. Aucune autre structure cellulaire n'est présente dans le flacon de culture. De ce fait, il n'y a pas d'interaction ou de communication avec d'autres types cellulaires [12]. Par conséquent, les cellules cultivées *in vitro* modifient souvent leurs propriétés cellulaires liées à leur taux de croissance, leur morphologie et leurs activités métaboliques intracellulaires [12]. De nouvelles approches sont nécessaires pour établir un microenvironnement se rapprochant de celui *in vivo*.

Pour imiter au mieux les microenvironnements du corps humain, le mouvement est un paramètre primordial. C'est pourquoi la notion de microfluidique est importante. Comme une grande partie des cellules *in vivo* sont en perpétuelle présence d'un flux, elles ont des caractéristiques différentes en présence de celui-ci. Le flux sanguin par exemple génère des forces de cisaillement qui régulent la fonction des cellules endothéliales, l'étanchéité de la barrière ou encore les jonctions serrées [17]. Les forces de cisaillement induisent l'élévation du nombre de jonction serrées, et donc une perméabilité à un médicament réduite. Des dispositifs microfluidiques pour les études de culture cellulaire gagnent rapidement en importance dans le développement de médicaments et les applications de recherche biologique telles que les études de toxicité de médicaments, de métabolisme ou de différenciation cellulaire.

Récemment, la perfusion dans des conditions physiologiques de systèmes *in vitro* a été développée pour fournir un environnement le plus proche de l'environnement *in vivo* par exemple, les conditions fluidiques ou les interactions d'organes. Une perfusion est l'injection longue et progressive d'un liquide (milieu de culture, molécule cible) principalement effectuée à l'aide de pompes et pouvant durer plusieurs semaines. Les cellules restent dans le système et l'évacuation du milieu utilisé peut être faite sans que l'on évacue les cellules en même temps. C'est un très grand avantage. Il est possible de modéliser et comparer le sort d'un produit chimique ou médicament dans une perfusion. Un exemple de système de tests *in vitro* est composé de cellules Caco-2 et des cellules HepG2, de manière à imiter l'absorption dans l'intestin grêle et le métabolisme intestinal et hépatique. Il a été montré que la perméabilité des cellules Caco-2 dans le système de culture perfusée par rapport au composé benzo- α -pyrène est plus proche des conditions *in vivo* que celle obtenue dans un système statique et que les activités métaboliques cellulaires observées sont plus élevées dans des conditions statiques [18].

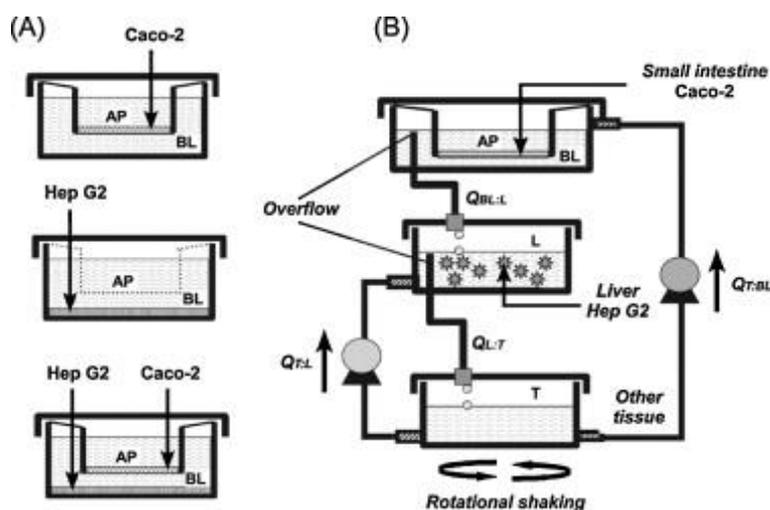


Figure 6 Représentation schématique des systèmes de coculture statiques et dynamiques. (A) Le système statique. En haut: cellules Caco-2, milieu: cellules HepG2, en bas: coculture Caco-2 et les cellules HepG2 (B) Le système dynamique. Les compartiments apicaux, basolatéraux, le foie et « autre tissu » sont désignés par AP, BL, L et T, respectivement. [18]

La comparaison est donc faite entre une coculture en système statique (Figure 6A) et des cultures séparées étant reliées l'une à l'autre en système dynamique (Figure 6B). Le système de perfusion en coculture consiste en un dispositif à trois compartiments représentant de l'intestin grêle, le foie et

d'autres tissus non-métabolisés (Figure 6B). Le petit compartiment de l'intestin est constitué de cellules Caco-2ensemencées sur une membrane semi-perméable, le compartiment hépatique est composé de cellules HepG2 et le compartiment « autres tissus », ne contient pas de cellules. Les trois compartiments sont reliés par un tube d'une manière physiologiquement pertinente. Dans ce qui suit, deux de ces systèmes sont présentés plus en détail.

1.4.1. Le système H μ REL[®]

L'une des plus importantes propriétés pharmacocinétiques de nouveaux médicaments prédites à partir de modèles *in vitro* est la clairance hépatique. Un nouveau système de culture microfluidique *in vitro* a été établi, il s'agit du dispositif de H μ REL[®] (Figure 7A) ayant été breveté. Le dispositif comprend plusieurs compartiments (Figure 7B) qui sont conçus pour être adaptés et proportionnels aux architectures physiologiques et améliorés par la prise en compte de l'écoulement. Une étude [19] démontre la possibilité d'utiliser le système H μ REL[®] pour la prédiction de la clairance hépatique. Des hépatocytes humains cryoconservés ont été ensemencés dans le dispositif de H μ REL[®] pour prédire la clairance hépatique *in vivo* de six composés modèles commercialisés (carbamazépine, la caféine, le timolol, le sildénafil, l'imipramine et le buspirone).

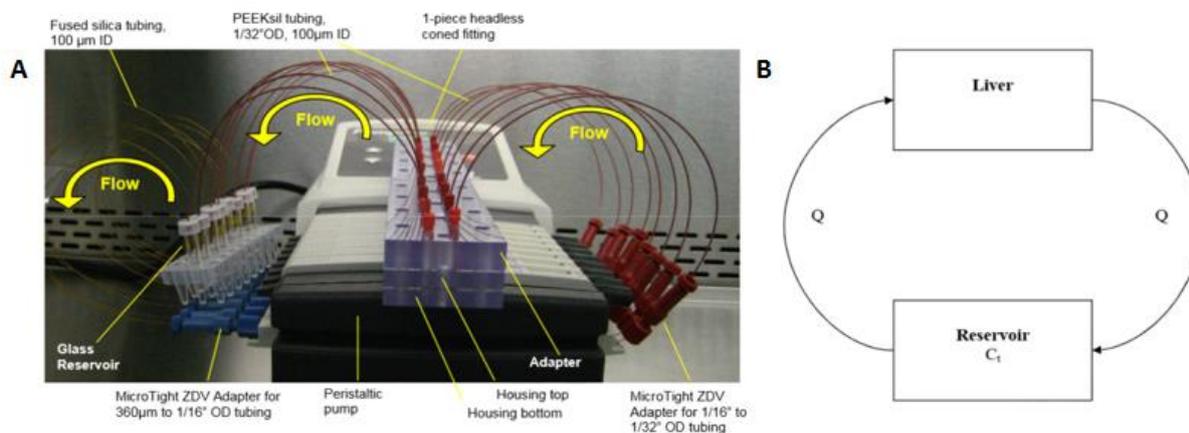


Figure 7 L'installation complète d'un instrument prototype H μ REL[®] et la représentation schématique du foie et le réservoir du système H μ REL[®]. (A) Une pompe péristaltique a été utilisée pour générer l'écoulement du milieu de culture. Deux logements H μ REL[®] fixe contenant chacun quatre bio-puces avec des cellules cultivées sur eux (pour un total de huit circuits microfluidiques configurés pour fonctionner en parallèle) ont été connectés à l'entrée et de sortie des tubes. (B) La flèche indique la direction de l'écoulement (Q). La chambre du foie représente le compartiment que l'élimination. CT est la concentration de médicament dans la solution du réservoir à un instant t. [19]

L'appareil est un ensemble de plaques de polycarbonate consistant en un fond de boîtier, une partie supérieure du boîtier et un adaptateur utilisé pour joindre les caractéristiques ouvertes de quatre bio-puces H μ REL[®]. La recirculation du milieu de culture à travers chacun des quatre dispositifs se fait sous une pression positive actionnée par une pompe hors-bord. La configuration de l'appareil prévoit quatre circuits microfluidiques, dont chacun utilise une des quatre bio-puces H μ REL[®] fonctionnant en parallèle et indépendamment de celui des trois autres. Par conséquent, dans cette configuration H μ REL[®], quatre expériences microfluidiques distincts peuvent être exécutées en parallèle.

1.4.2. Le système HuMiX

Les changements dans le microbiome gastro-intestinal humain sont associés à plusieurs maladies. Pour déduire la causalité, des expériences sur des modèles représentatifs sont essentiels. Un modèle basé sur la microfluidique (HuMiX) [20] a été établi permettant la coculture de cellules humaines et microbiennes dans des conditions représentatives de l'interface homme-microbe gastro-intestinal (Figure 8). La capacité de HuMiX de récapituler les réponses *in vivo* transcriptionnelles, métaboliques et immunologiques a été établie sur les cellules épithéliales intestinales humaines. Les cellules Caco-2

sont mises en coculture avec le commensal *Lactobacillus rhamnosus* cultivés dans des conditions anaérobies ou avec *Bacteroides caccae* cultivés en anaérobie stricte. HuMiX facilite les recherches sur les interactions moléculaires hôte-microbe et donne un aperçu de toute une gamme de questions de recherche fondamentale liant le microbiome gastro-intestinal à la santé et la maladie.

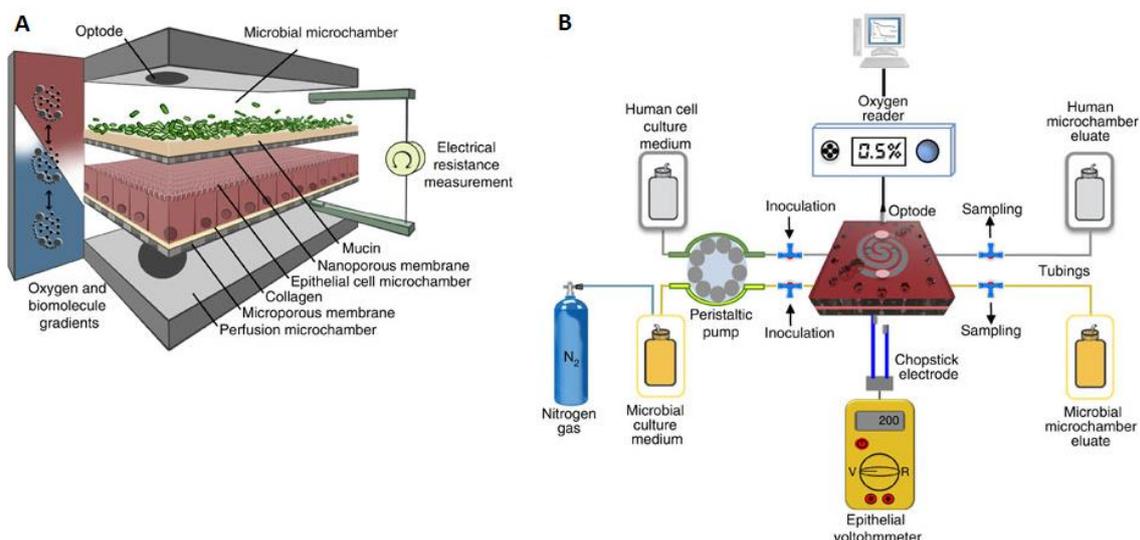


Figure 8 Le modèle HuMiX : (A) Diagramme conceptuel du modèle HuMiX pour la coculture représentative de cellules épithéliales humaines avec microbiote gastro-intestinal. (B) Schéma de la mise en place expérimentale du modèle HuMiX avec des dispositions pour la perfusion des milieux de culture oxygène et anoxique, ainsi que la surveillance de la concentration en oxygène et la résistance électrique transépithéliale. La concentration en oxygène dans le milieu anoxique est maintenue à 0,1% en faisant barboter en continu le milieu avec du diazote. [20]

HuMiX se compose de trois microchambres: une microchambre pour la perfusion du milieu, une microchambre pour la culture des cellules épithéliales humaines et une microchambre pour la culture microbienne. Chaque microchambre possède une entrée et une sortie dédiée à l'inoculation des cellules ainsi que pour le contrôle précis des paramètres physico-chimiques. En juxtaposant les cellules humaines et microbiennes à une distance de 0,5-1 mm de chaque côté d'une membrane nanoporeuse, le modèle HuMiX est représentatif d'une barrière épithéliale saine et intacte. En outre, des capteurs d'oxygène sont intégrés dans le modèle pour la surveillance en temps réel des concentrations d'oxygène dissous dans le dispositif. De plus, une version spéciale de HuMiX permet l'insertion d'une électrode de style chopstick commercial (STX2; Millipore), afin de surveiller le TEER pour la caractérisation de la croissance cellulaire et la différenciation au sein du dispositif. Les mesures ont été faites avec ERS-2 Epithelial Volt-Ohm Meter (Millicell).

1.5. Quelques modèles *in vitro* de barrières intégrant la fluidique le TEER

1.5.1. Modèles de barrière hémato-encéphalique (BHE)

La barrière hémato-encéphalique (BHE) est une barrière très sélective pour le système nerveux central (SNC) [21]. Un modèle de barrière hémato-encéphalique intégrant de la microfluidique (μ BBB) (Figure 9) [22] a été développé. Il s'agit d'un modèle académique. Celui-ci imite pertinemment la BHE *in vivo* grâce à un environnement dynamique et une membrane de culture relativement mince (10 μ m). La validité du modèle μ BBB a été faite avec des cellules endothéliales b.End3, celles-ci cultivées à la fois avec et sans astrocytes C8 D1A en coculture. La résistance électrotransendothéliale (TEER) a été utilisée afin de déterminer la croissance cellulaire, ainsi que l'intégrité des jonctions serrées. Après trois jours de culture, une différence dix fois supérieure de valeurs de TEER a été aperçue entre la μ BBB (250 $\Omega \cdot \text{cm}^2$) et la culture statique (25 $\Omega \cdot \text{cm}^2$). La stabilité du modèle a été démontrée par une baisse transitoire instantanée du TEER en réponse à l'exposition à de l'histamine, suivie d'un retour à la valeur

initiale. Ces résultats démontrent que le système μ BBB développé est un modèle valable pour des études de la fonction BHE et l'administration de médicaments.

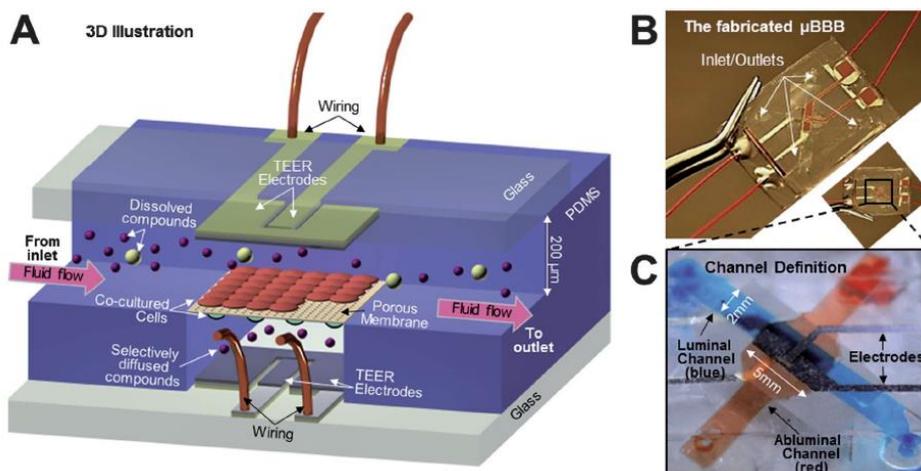


Figure 9 Structure et conception du μ BBB. (A) Le système μ BBB comprend deux canaux d'écoulement perpendiculaires. (B) Le μ BBB entièrement fabriqué. (C) Vue rapprochée. Les cellules endothéliales et les astrocytes sont mis en culture sur les côtés du lumen, respectivement de l'autre côté du lumen de la membrane poreuse. [22]

Les modèles actuels pour imiter la barrière hémato-encéphalique (BHE) utilisent en grande partie des inserts séparés par une membrane poreuse pour étudier perméabilité de la barrière. Un modèle de la BHE avec de la microfluidique a été établi (SyM-BBB) [23]. La plate-forme SyM-BBB (Figure 10) est composée d'une matière plastique, d'une puce microfluidique jetable et une microcirculation contenant une chambre à deux compartiments. Le côté apical individuellement atteignable est ensemencé avec des cellules endothéliales et le côté basolatéral peut supporter des cellules neuronales ou des milieux conditionnés.

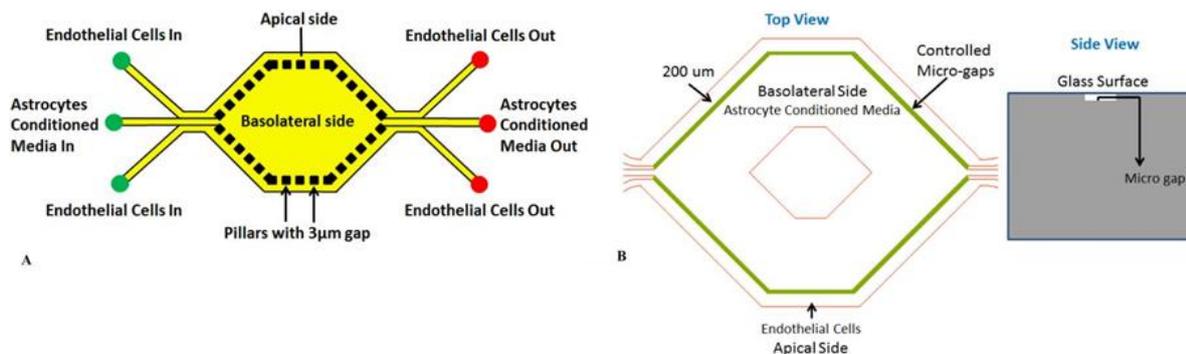


Figure 10 Modèle SyM-BBB (A) Concept montrant le côté apical et basolatéral séparés par 3 μ m d'interstices formés par des piliers microfabriqués. Le côté apical contient des cellules endothéliales, le côté basolatéral contient des astrocytes ou du milieu conditionné. (B) Vue schématique de dessus et de côté en soulignant l'écart de 3 μ m formé entre la surface du verre et le polymère. La chambre basolatérale est prise en charge dans le centre par une structure de support pour empêcher l'effondrement de la partie supérieure de la chambre microfabriquée. [23]

Une caractéristique commune de la microvascularisation est la présence de bifurcations divergente et convergente. Pour imiter cette caractéristique, le dispositif a été conçu pour représenter une construction idéalisée de la microvascularisation comme représenté conceptuellement sur la figure 10. Le dispositif se compose d'une chambre de 200 μ m de largeur externe (côté apical) séparée par une chambre centrale (côté basolatéral). Les deux chambres font 100 μ m de profondeur. Les

informations proviennent d'observations *in vivo*. Chacune de ces chambres est indépendante, c'est-à-dire qu'elles ont leur propre canal d'entrée et de sortie pour la perfusion et de l'échantillonnage des milieux (Figure 10A). Une caractéristique importante de la conception est la nécessité d'utiliser deux couches de fabrication pour développer un écart de 3 μm entre les deux chambres. Il s'agit d'imiter la taille des pores couramment utilisés dans les membranes utilisés dans les inserts. Ces pores permettent entre autre l'étude de la perméabilité du modèle.

Outre l'intégration de la mesure du TEER, l'avancement des systèmes précédents est l'utilisation de cocultures afin de modéliser la BHE *in vitro*. Cela ne s'arrête pas à la coculture mais peut aller encore plus loin comme des tri-cultures [24], quadri-cultures, etc. Les modèles *in vitro* de BHE utilisent souvent des cellules endothéliales de cerveau et des astrocytes murins ou d'origine porcine. Par conséquent, les résultats obtenus à partir de ces modèles expérimentaux peuvent être difficiles à extrapoler à l'homme dans la situation *in vivo*, car ils ne sont pas d'origine humaine. Les valeurs du TEER mesurées sur des cellules endothéliales humaines *in vitro* ne sont pas très élevées quand elles sont cultivées seules. Une coculture avec des péricytes ou des astrocytes permet d'augmenter ces valeurs par une augmentation des jonctions serrées entre les cellules. Un projet de modèle *in vitro* nommé Transwell-BB [24] utilise un système à plusieurs cultures de cellules humaines. Des cellules endothéliales microvasculaires cérébrales (hCMEC/D3), des astrocytes (CC-2565 et SC-1810) et des péricytes cérébraux (HBVP) sont utilisés dans différentes permutations (Figure 11) afin de trouver laquelle est la plus efficace en termes de TEER des jonctions serrées. Les modèles sont utilisés donc en mono-, co-, ou tri-cultures et sont supplémentés par du sérum humain. Le modèle le plus réussi se trouve être la coculture de cellules endothéliales et d'astrocytes.

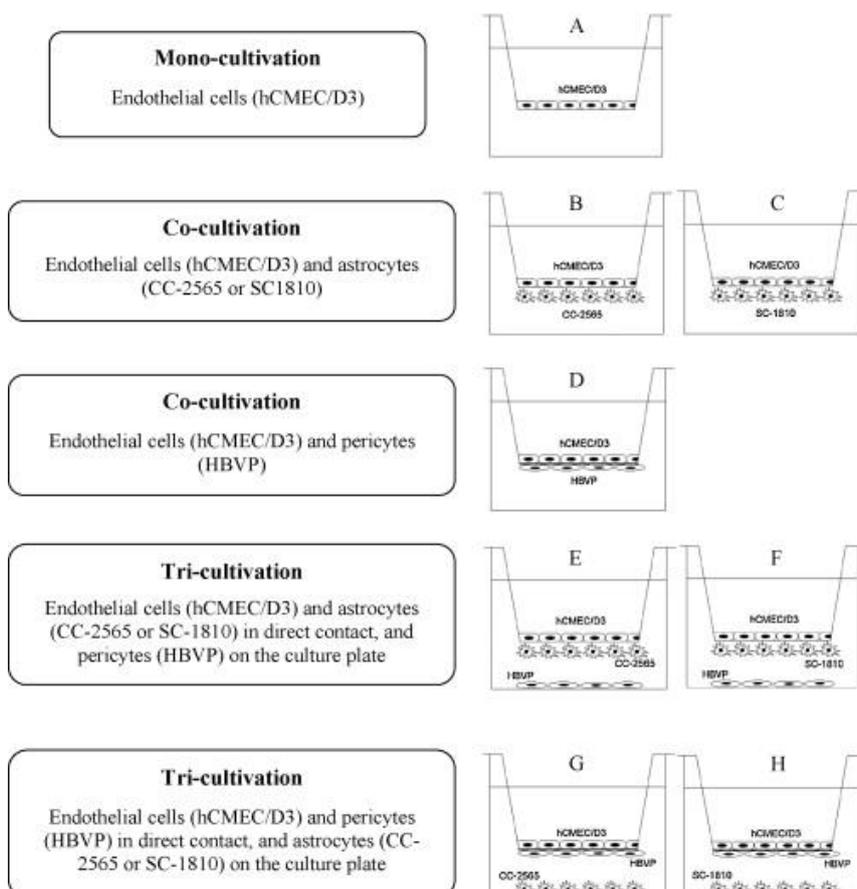


Figure 11 Schéma du projet Transwell-BB comprenant (A) hCMEC / D3 mono-culture, (B) hCMEC / D3 et CC-2565 coculture, (C) hCMEC / D3 et SC-1810 coculture (D) hCMEC / D3 et HBVP coculture, (E) hCMEC / D3, CC-2565 et HBVP tri-culture, (F) hCMEC / D3, SC-1810, et HBVP tri-culture, (G) hCMEC / D3, HBVP et CC-2565 tri-culture, et (H) hCMEC / D3, HBVP et SC-1810 tri-culture. [24]

Les communications cellulaires provenant des astrocytes et des péricytes jouent un rôle important dans l'induction de la fonction de la barrière physiologique BHE. Mais ce modèle n'est de loin pas celui qui modélise le mieux la BHE.

Afin d'améliorer le phénotype de la BHE *in vitro* modélisée, un groupe de scientifique ont eu recours à divers méthodes. Un système de culture de plusieurs cellules a été mis en place [25]. En effet pour refléter au mieux la barrière hémato-encéphalique, des cellules endothéliales microvasculaires cérébrales (BMECs) ont été cultivées en présence de péricytes humains, d'astrocytes humains et de neurones dérivées de cellules renouvelables. Les cellules endothéliales ont été dérivées à partir de cellules souches pluripotentes (HPSC). Pour cette « coculture », de l'acide rétinoïque a été ajouté au milieu de culture et les résultats parlent d'eux même.

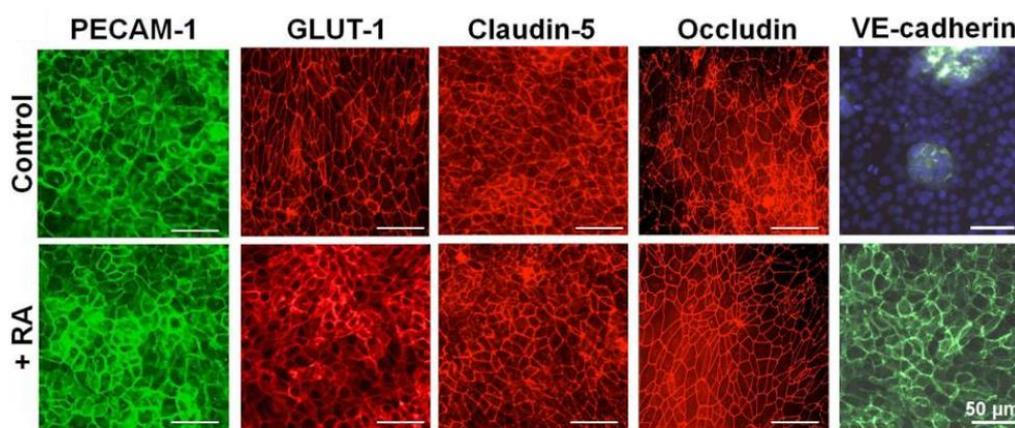


Figure 12 Coloration par fluorescence des cellules BMECs en présence de péricytes, d'astrocytes et de neurones après ajout d'acide rétinoïque : Expression de PECAM-1, GLUT-1, occludine, claudine-5 et de la VE-cadhérine. [25]

En présence, d'acide rétinoïque, les cellules expriment la glycoprotéine VE-cadhérine (Figure 12). La VE-cadhérine, exprimée dans les cellules endothéliales, permet l'adhésion entre les cellules endothéliales et est nécessaire à la survie de ces cellules. De plus, de moduler les jonctions adhérentes en augmentant l'expression de VE-cadhérine, l'acide rétinoïque permet des changements dans l'expression des protéines des jonctions serrées. L'expression de l'occludine est augmentée de 4 fois, tandis que l'expression de la claudine-5 est diminuée de 1.7 fois. L'acide rétinoïque est donc bénéfique pour le phénotype des cellules [25-26]

1.5.2. Modèles de barrière rénale

L'épithélium tubulaire du rein est responsable de la réabsorption des sels, de l'eau, et d'autres composés organiques. Il serait donc avantageux d'être capable d'étudier les processus de transport de l'épithélium rénal dans un modèle *in vitro* reproduisant pertinemment l'architecture *in vivo* du rein. Il faudrait appliquer un écoulement de fluide physiologiquement approprié et permettent le transport dans les deux sens (A-B et B-A) des solutés et de l'eau. La mesure du TEER serait bénéfique pour vérifier l'intégrité de la barrière. Une option prometteuse pour le développement d'un tel système est l'utilisation d'un bioréacteur à perfusion microfluidique [26].

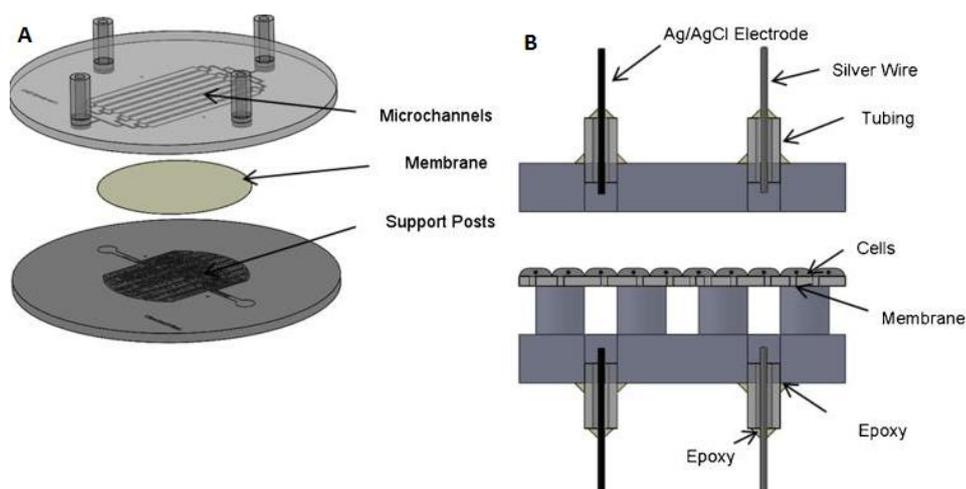


Figure 13 Bioréacteur à perfusion microfluidique A : vue éclatée du bioréacteur, B : schéma de la configuration d'électrode TEER constituée d'une électrode Ag / AgCl et une électrode d'Ag de chaque côté de la membrane. [27]

Un système microfluidique dédié à la recherche avec des électrodes intégrées pour la mesure du TEER a été mis au point afin de caractériser des cellules épithéliales rénales dans des conditions d'écoulement de fluide physiologiquement identique. Le bioréacteur (Figure 13A) est constitué de deux chambres une apicale et l'autre basolatérale reliées par une membrane microporeuse transparente. La chambre supérieure contient des canaux microfluidiques afin de perfuser la surface apicale des cellules. La chambre inférieure agit comme un réservoir pour le transport à travers la couche cellulaire et fournit un support pour la membrane. Les électrodes intégrées (Figure 13B) permettent de surveiller la croissance cellulaire et d'évaluer les jonctions cellule-cellule soit l'intégrité des jonctions serrées.

Un autre instrument de mesure a été développé pour étudier les effets des xénobiotiques. Les xénobiotiques sont des substances présentes dans le corps mais qui lui sont étrangères, ils ne sont ni produit par l'organisme, ni par son alimentation. Les xénobiotiques sont en général des molécules chimiques étant considérées comme polluantes et toxiques au sein d'un organisme. Les plus grands cas de xénobiotiques sont les pesticides et les antibiotiques. Cet instrument permettant l'analyse de ces composés chimiques est un bioréacteur microfluidique intégrant génie tissulaire et microtechnique [28]. Le bioréacteur (Figure 14) consiste en une coculture de foie et de rein, car le foie est le site principal de la biotransformation des xénobiotiques et le rein est le site majeur de leur élimination. Certain médicament comme l'ifosfamide qui est un médicament traitant certaines tumeurs peut créer des substances néphrotoxiques après leur biotransformation.

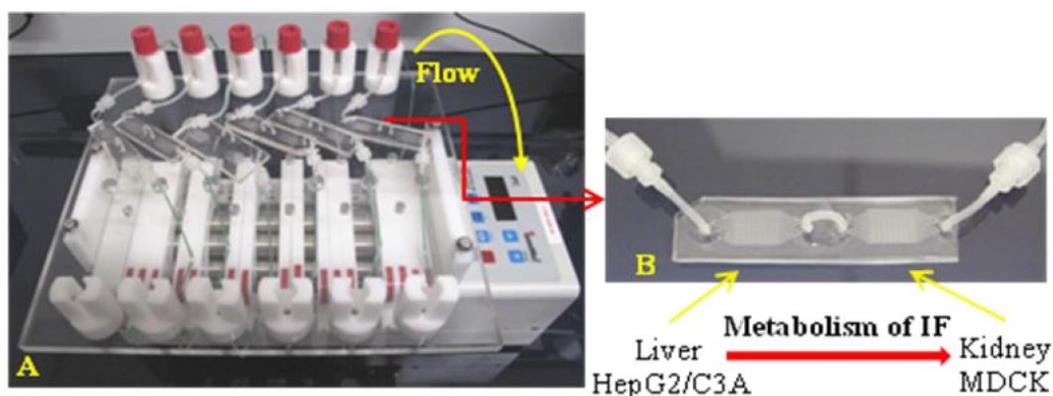


Figure 14 Photo du système de perfusion (A) et les détails du bioréacteur microfluidique foie-rein (B). [28]

Les deux types cellulaires utilisés sont les cellules HepG2/C3A pour le foie les cellules MDCK (Madin-Darby Canine Kidney) pour le rein. Le bioréacteur est fabriqué en polydiméthylsiloxane qui est biocompatible et perméable au gaz. Il permet donc l'oxygénation des cellules. De plus, c'est un matériau transparent et permet d'observer les cellules au microscope. Il contient deux chambres séparées pour faire croître les deux types cellulaires différents (Figure 14).

Concernant le rein plus spécifiquement, un dispositif bioartificiel basé sur de la microfluidique représentant une structure de tubule proximal du rein a été développé [29]. Ce dispositif ressemble à la situation *in vivo* et intègre des cellules souches adultes de tubule rénal (ARPCs). Le dispositif (Figure 15) est composé de deux couches superposées en polydiméthylsiloxane (PDMS) avec entre deux une membrane poreuse. Pour ressembler le maximum à la situation réelle, le microcanal supérieur permet un apport une surface de lumière adéquat, la partie apicale des cellules y est exposée. Le microcanal inférieur lui simule la zone interstitielle en contact avec la membrane basolatérale des cellules.

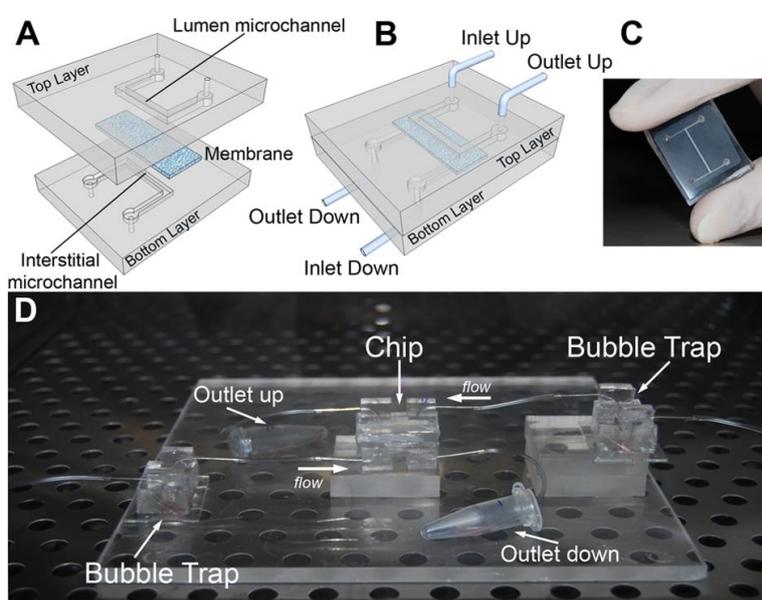


Figure 15 Le microdispositif rénale bio-inspirée.

La puce est semblable à la structure *in vivo* d'un tubule proximal de rein et est composé de deux couches superposées en PDMS (A), avec des microcanaux gravés. Les deux microcanaux simulent la zone de passage dans laquelle la partie apicale des cellules est exposée (canal haut) et la zone interstitielle en contact avec la membrane basolatérale (canal bas). Les canaux sont séparés physiquement par une membrane microporeuse. Une fois assemblées (B), le dispositif présente deux entrée et deux sortie, chacune reliée à des tubes en plastique et des pompes à seringue pour le contrôle des fluides. (C) Photographie du dispositif microfluidique de tubule proximal bioartificiel. (D) Dispositif expérimental complet [29]

Le polydiméthylsiloxane, comme précédemment, a été choisi pour sa perméabilité à l'oxygène, pour sa transparence et sa facilité d'utilisation. Le dispositif est relié à deux pièges à bulles (Figure 15D) pour empêcher l'entrée des bulles d'air et assurer la viabilité des cellules mises en culture dans la puce électronique. En fait, quand une bulle d'air se rapproche des cellules, celles-ci peuvent être étirées par des forces exercées à l'interface liquide-air, ce qui peut conduire à la rupture des membranes cellulaires [30].

2. Matériels et méthodes

2.1. Culture cellulaire

2.1.1. Comptage des cellules

Le comptage des cellules s'est effectué pour chaque expérience et à chaque passage de la même manière. 10 µl de bleu Trypan (Gibco) ont été mélangés avec 10 µl de suspension cellulaire à compter. Puis 15 µl du mix ont été chargés dans la chambre de comptage (Luna Cell Counting Slides) et ont été placés sur le lecteur de comptage (Luna Automated Cell Counter) [Annexe 8.1].

2.1.2. Cellules MPK (Mouse Kidney Cortical Collecting Tube)

Les cellules MPK ont été cultivées dans du DMEM-F12 avec du rouge de phénol-GlutaMAX (Gibco) supplémenté avec 5 µg/ml d'insuline, 50 nM de dexaméthasone, 60 nM de sélénium, 5 µg/ml de transferrine, 1 nM de triiodothyronine, 5 ng/ml de facteur de croissance épidermiques de souris, 100 U de streptomycine et pénicilline et 2% de sérum fœtal de veau (tous Sigma) à 37°C, 5% de CO₂.

Les passages se sont effectués tous les 3-4 jours [Annexe 8.2] et la culture s'est faite dans des flasques T25, T75 ou T125 (tous Falcon). Les inserts (Corning Incorporated) utilisés pour les expériences ont une porosité de 0.3 ou 0.4 µm et ont une membrane en polyester. Les inserts sont cultivés dans des plaques de cultures en polystyrène avec couvercle en polystyrène fournies avec les inserts. Les cellules MPK ont étéensemencées sur et sous l'insert. L'ensemencement sur l'insert a été fait comme l'ensemencement d'un puits soit le liquide dans le compartiment supérieur de l'insert. Pour l'ensemencement sous la membrane, les inserts ont été tournés à 180 degrés afin d'y déposer le milieu et les cellules sur la membrane inférieure. Un volume maximal de 80 µl était déposé sur la membrane et les inserts étaient incubés toute une nuit dans cette position à 37°C, 5% CO₂ avant d'être retournés.

2.1.3. Ensemencement des cellules

Le nombre de cellulesensemencées diffère selon le récipient de culture et est présenté dans le tableau 2 ci-dessous.

Tableau 2 Informations sur les récipients de culture utilisés (surface, volume de milieu, cellulesensemencées)

Récipient	Marque/Référence	Insert / Puit	Surface [cm ²]	Volume de milieu [ml]	Nombre de cellulesensemencées
Falcon T25	Falcon / 35 3109		25	3	130'000 - 160'000
Falcon T75	Falcon / 35 3110		75	10	400'000 - 500'000
Falcon T150	Falcon / 35 3118		150	20	800'000 - 1'000'000
Plaque 12 puits	Corning Incorporated / Costar 3460	Insert	1.12	0.76	200'000
		Puit	3.5	1.6	400'000
Plaque 24 puits	Corning Incorporated / Costar 3470	Insert	0.33	0.26	70'000
		Puit	1.9	0.8	200'000
Plaque 96 puits	Corning Incorporated / Costar 3603		0.33	0.2	50'000

2.2. Test de viabilité

Un test de viabilité [Annexe 8.7] a été effectué sur les cellules confluentes à 100%. Les cellules ont été incubées 30 minutes à 37°C, 5% CO₂ dans une solution contenant de la calcéine (Sigma), de l'iodure de propidium et du colorant Hoechst (Invitrogen). La fluorescence a été lue avec une Flexstation 3

(Molecular Devices) aux longueurs d'onde correspondantes. Des images ont été prises avec un microscope inversé à fluorescence (Leica).

2.3. Immuno-marquage membranaire des jonctions serrées ZO-1

Un protocole utilisé avec un seul tampon a été utilisé [Annexe 8.6]. Brièvement, les cellules ont été fixées dans du PFA/PBS 2% pendant 10 minutes. Puis les échantillons de cellules ont été bloqués dans un tampon contenant du sérum de chèvre, de l'albumine de sérum bovin (Sigma), du Triton et de la Glycine pendant une heure. Pour l'immuno-marquage, un anticorps primaire polyclonal de lapin IgG ZO-1 (Invitrogen) a été utilisé et incubé toute la nuit à 4°C sur les cellules. Un anticorps secondaire anti-lapin couplé à un fluorochrome a été incubé 2 heures à température ambiante. Des lavages au PBS ont été effectués entre chaque étape. Des images ont été prises avec un microscope à fluorescence (Leica).

2.4. Test de perméabilité

Un composé fluorescent n'étant pas métabolisé par les cellules a été utilisé pour le test de perméabilité, soit le Jaune lucifer (Sigma-Aldrich). Une fois la monocouche confluente et préalablementensemencée sur des inserts, il consistait à transférer [Annexe 8.7] les inserts avec les cellules dans des plaques receveuses contenant un tampon Ringer HEPES [Annexe 8.6]. Une concentration connue de Jaune lucifer a ensuite été ajoutée au-dessus des inserts, celui-ci dilué dans du tampon HEPES. Puis, toutes les 15 minutes chaque insert a été transféré dans un nouveau puit contenant du tampon HEPES, ceci pendant une heure (3 changements). La mesure de la quantité de Jaune lucifer ayant traversé la barrière cellulaire a été faite avec une Flexstation 3 (Molecular Devices) à 430nm/535nm (Excitation/Emission). Le calcul du coefficient de perméabilité s'est fait grâce à une feuille Excel déjà prévu à cet effet [Annexe 8.4]. Le calcul permettant d'obtenir un coefficient de perméabilité est montré dans l'équation 2.

$$Pe = \frac{1}{\frac{1}{PSt} - \frac{1}{PSf}} \cdot A$$

Équation 2 Equation permettant de définir le coefficient de perméabilité des cellules endothéliales (Pe) en cm/min ; PSt = Perméabilité de la surface testée [μl/min] ; PSf = Perméabilité de la surface de la membrane [μl/min] ; A = Surface de la membrane [cm²]. La surface de la membrane et la perméabilité de la surface de la membrane restent constantes, tandis que la perméabilité de la surface testée est une variable.

Les différentes perméabilités peuvent être reliées par une formule présentée dans l'équation 3 ci-dessous.

$$\frac{1}{PSe} = \frac{1}{PSt} - \frac{1}{PSf}$$

Équation 3 Equation mettant en lien les différentes perméabilités de surface : PSe = Perméabilité de la surface des cellules endothéliales [μl/min] ; PSt = Perméabilité de la surface testée [μl/min] ; PSf = Perméabilité de la surface de la membrane [μl/min].

2.5. Test de biocompatibilité

Un test de biocompatibilité a été effectué sur quelques composants majeurs du Cellware Hepia qui sont en contact avec les cellules pour évaluer s'ils présentaient un danger pour celles-ci. Un carré de 2.25 cm² du scotch 467MP 200MP Adhesive (3M) et une goutte d'environ la même surface de la colle EPO-TEK® (EPOXY TECHNOLOGY) ont été posé au fond de puits de 3.5 cm². Des cellules MPK ont étéensemencées par-dessus à raison de 178'600 cellules/cm² avec 3 ml de milieu de culture. Après 4 jours de croissance, le milieu a été retiré et des photos ont été prises. Puis un test de viabilité [Annexe 8.7] a été effectué sur les cellules à confluence sur les différents composants. La plaque de culture n'a pas été testée car le polystyrène ne pose aucun problème pour la croissance des cellules. L'innox n'a pas

été testé supposant que celui-ci n'étant pas en contact direct avec les cellules ne présentait aucun danger.

2.6. Test de toxicité

Les cellules MPK ont étéensemencées sur des inserts (0.33 cm²) et cultivées jusqu'à confluence, ce qui correspond à un TEER d'une valeur d'environ 5'000 Ohms*cm². Puis le milieu a été changé et remplacé par un milieu contenant un composé à tester. Pour ce test, le composé est du mannitol. Le mannitol (C₆H₁₄O₆) est un polyol. Le mannitol a tendance à perdre un ion hydrogène en solution aqueuse, résultant en une acidification de la solution. Il est utilisé pour réduire la pression intracrânienne dans les cas de traumatisme crâniens graves [31]. Il présente un risque de déséquilibre hydroélectrolytique. Le mannitol est éliminé par les glomérules rénaux et n'est pas absorbé au niveau des tubules. C'est-à-dire qu'il n'est pas absorbé dans le sang mais éliminé avec l'urine. De ce fait, il entraîne une élimination obligatoire d'une certaine quantité d'eau. Par contre le débit de filtration est diminué avec la présence de mannitol [32]. Le mannitol est aussi utilisé pour traiter l'insuffisance rénale, mais la capacité de cet agent normalement inoffensif pour traiter l'insuffisance rénale n'est pas bien reconnue. Différentes concentrations croissantes de mannitol ont été effectuées dans un intervalle de 10 µM à 1M (10 µM, 100 µM, 1 mM, 10 mM, 100 mM, 500 mM, 750 mM et 1 M). Deux types d'expositions au composé existent soit une exposition aiguë (quelques heures) ou une exposition chronique (quelques jours). Dans ce cas, l'exposition de type aiguë a été testée. Les cellules ont été mises en présence de mannitol pendant 2 heures. Dans ce cas, la partie basolatérale a été choisie afin de d'imiter le flux sanguin sur les cellules comme il se trouve *in vivo*. Le monitoring s'est effectué à l'aide du Cellware Hepia.

2.7. Mesure du TEER

Lors d'une mesure de TEER, le système de mesure comprend différents composants. Le Cellware composé des électrodes et accueillant le milieu ainsi que les inserts, les inserts permettant de faire croître des cellules sur leur membrane et une partie électronique servant à mesurer la résistance sont montrés à la figure 16.

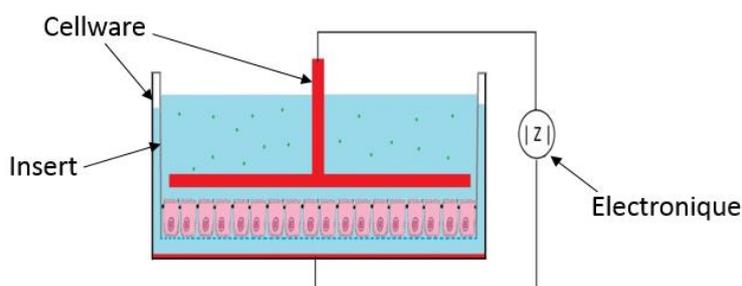


Figure 16 Schéma des composants utiles à la mesure du TEER

Les mesures du TEER ont été faites de trois manières différentes : soit avec le Cellware Hepia (Figure 17C), soit avec le CellZscope (Figure 17B) ou soit avec le Millicell (Figure 17A). Le Cellware et le CellZscope utilise une partie électronique et programme informatique afin de traiter les résultats et pour le contrôle de la mesure de l'impédance. Dans les deux cas, l'électronique du CellZscope (Figure 17D) a été utilisée pour toutes les mesures. L'interface de contrôle et des résultats des mesures du TEER sont présentés en annexe 8.10. Les mesures en monitoring ont été effectuées toutes les 15 minutes sur toute la durée de celui-ci. Le Millicell n'utilise pas de programme informatique. Il mesure la résistance comme un voltmètre grâce à deux électrodes dites « chop sticks » placées une dans la partie basolatérale et l'autre dans la partie apicale. Comme dit précédemment le principal désavantage du Millicell est que la mesure n'est pas stable. Du fait que la distance entre les électrodes change est

différente à chaque et peut bouger même durant une mesure, les fluctuations de TEER sont énormes et cela ne permet pas des mesures de TEER très fiables.



Figure 17 Imagerie des différents systèmes de mesure de l'impédance : (A) Millicell (Millipore) avec l'électrode type chop stick ; (B) Cellware du CellZscope (NanoAnalytics) ; (C) Cellware Hepia avec le connecteur pour l'électronique du CellZscope ; (D) Electronique du CellZscope avec spectre d'impédance sur l'écran d'ordinateur

2.8. Utilisation et contrôle des systèmes de fluidique

Les systèmes de microfluidique (Figure 18A, B et C) utilisent des pompes péristaltiques (Welco) ayant des débits indiqués dans les résultats.

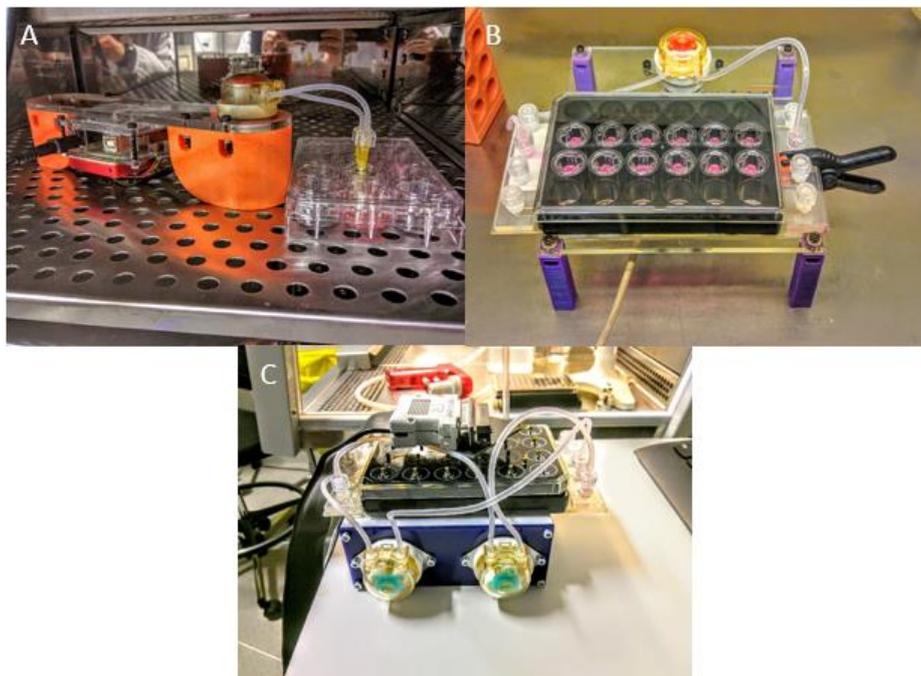


Figure 18 Imagerie des systèmes de microfluidique : (A) Système de fluidique par-dessus la couche cellulaire; pompe péristaltique RN42-E475 avec un débit minimal de 55.4 $\mu\text{l}/\text{min}$; (B) Système de fluidique par-dessous la couche cellulaire; pompe péristaltique E686 avec un débit minimal de 516 $\mu\text{l}/\text{min}$; (C) Système complet de monitoring du TEER intégrant de la fluidique. Deux pompes péristaltiques RNBT-824D avec chacune un débit différent (20 $\mu\text{l}/\text{min}$ et 46 $\mu\text{l}/\text{min}$) permettent de mettre les cellules en présence d'un flux.

L'avantage des systèmes de microfluidique utilisés est que ceux-ci peuvent rester dans l'incubateur le temps souhaité. La pompe est contrôlée par un système Bluetooth et peut de ce fait être contrôlée par un smartphone, tablette, etc. La figure 19 présente l'interface utilisée par l'application PMI développée par Hepia. Cette application permet donc de choisir le pourcentage de puissance de la pompe qui devra préalablement être calibrée. Les pompes peuvent tourner dans les deux sens et le contrôle de quatre pompes sur le même appareil peut être assuré.

Figure 19 Interface de l'application PMI permettant le contrôle des pompes péristaltiques



2.9. Cellware Hepia

Le Cellware Hepia est donc un appareil conçu par les ingénieurs du laboratoire du Prof. Luc Stoppini. Celui-ci vise à intégrer de la fluidique dans un appareil pouvant mesurer l'impédance *in vitro* d'une barrière physiologique. La figure 20A présente une éclatée de vue du Cellware Hepia avec fluidique.

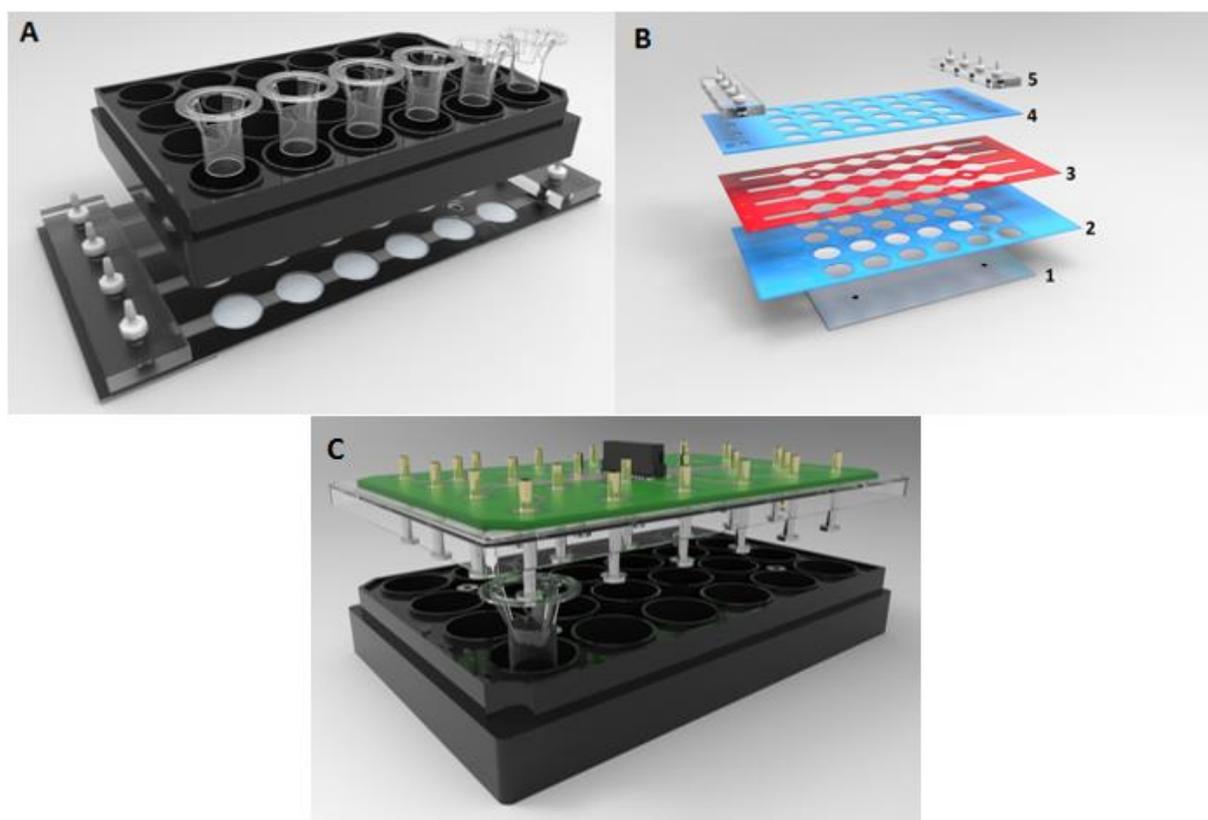


Figure 20 Eclatée de vue du Cellware Hepia intégrant de la fluidique ; (A) Eclatée de vue de la partie inférieure du Cellware Hepia une plaque 24 puits est associée à un PCB contenant un canal afin d'y ajouter le flux ; des connecteurs pour les pompes se trouvent de chaque côté de ces canaux ; (B) 1 : Electrode inférieure en inox ; 2 : Couche de plexiglas percée uniquement à la taille des puits ; 3 : Couche de plexiglas incluant le dessin des canaux entre les puits ; 4 : Couche de plexiglas trouée d'un côté et de l'autre de chaque puit afin que le liquide puisse circuler ; 5 : Connecteur permettant de relier les pompes au Cellware par des tuyaux ; (C) Eclatée de vue du Cellware Hepia complet

Le Cellware Hepia est construit par couche de la façon suivante (du bas vers le haut) : l'électrode inférieure (Figure 20B 1) ; les canaux et la plaque de culture. La base du montage est les canaux (Figure 20B). Ceux-ci sont composés de trois couches différentes : tout en bas une couche de plexiglas formée seulement des trous de chaque puit (Figure 20B 2), au-dessus se trouve une couche de plexiglas avec les canaux entre les puits dessinés (Figure 20B 3), et juste au-dessus encore une plaque de plexiglas trouée d'un côté et de l'autre de chaque puit afin que le liquide puisse circuler (Figure 20B 4). Des

connecteurs sont placés de chaque côté de l'appareil afin de pouvoir connecter des pompes au Cellware Hepia pour y ajouter un flux grâce à des tuyaux en silicone (Tygon) (Figure 20B 5). De chaque côté de cette couche triple de plexiglas, un scotch double face 3M Adhesive est collé. Pour la partie inférieure, la plaque en inox servant d'électrode vient plaquer les couches de plexiglas et collée grâce à du scotch. Pour la partie supérieure, une plaque de culture avec des puits sans fond (Greiner Bio-one) est posée sur le scotch et chaque tour de puit venant appuyé sur le plexiglas s'y voit déposé de la colle EPO-TEK® (EPOXY TECHNOLOGY) afin d'assurer l'étanchéité. Un ou plusieurs plots en inox viennent se fixer sur l'électrode inférieure afin de pouvoir faire une connexion entre l'électrode inférieure et l'électronique. Ce plot remplace le câble qui dans la version précédente avait la même utilisation (Annexe 8.9). Le tout est séché durant 48 heures minimum avec un temps de passage au four de 3 heures à 65°C. Le principal problème du montage est les fuites. En effet, avec la colle et le scotch, il faut assurer l'étanchéité de l'appareil afin de ne pas perdre de milieu de culture. Le temps de séchage est très important ainsi que la précision de la position de chaque couche de l'appareil. En présence de liquide, le volume des puits s'équilibre de la façon dite en vase communicant.

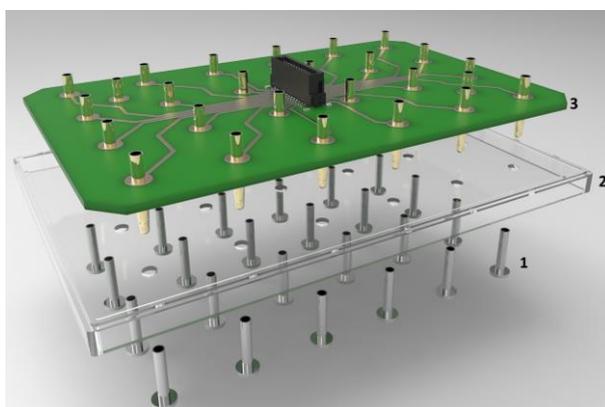


Figure 21 Eclatée de vue de la partie supérieure du Cellware Hepia ; 1 : Electrode supérieure en inox ; 2 : Couvercle de plaque de culture perforé au-dessus de chaque puit pour laisser passer les électrodes ; 3 : PCB équipé de toute la partie électronique reliant les électrodes au connecteur (partie noire)

Le couvercle (Figure 21) quant à lui contient un couvercle de plaque de culture percé au-dessus de chaque puit avec de pouvoir laisser passer un petit connecteur plaqué or sur lequel l'électrode est fixée. Sur ce couvercle, un PCB de même forme est scotché. Ce PCB contient des circuits électriques reliant le connecteur aux électrodes de chaque puit. Des tiges plaquées or sont présentes aux mêmes endroits que les plots sur la plaque de culture. Elles permettent donc la connexion entre la plaque de culture (électrode inférieure) et le couvercle (électronique).

3. Résultats

3.1. Caractérisation des cellules MPK

Pour caractériser les cellules MPK, la mesure du TEER a été monitorée en fonction du temps avec le CellZscope. La figure 22 présente ce monitoring. Les cellules ont étéensemencées sur et sous la membrane des inserts afin de comparer la formation de la barrière.

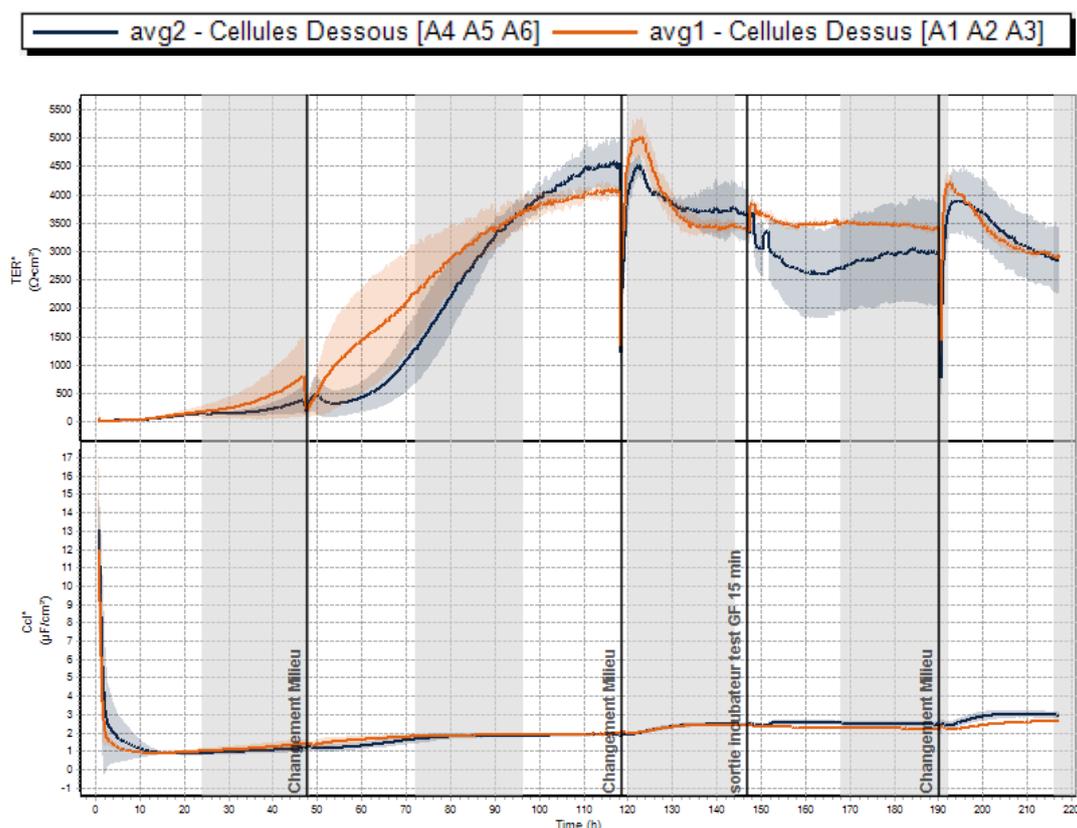


Figure 22 Monitoring avec CellZscope des cellules MPK sur une semaine ; Ligne rouge : moyenne des cellulesensemencées sur le dessus de la membrane ($n=3$) ; Ligne noire : moyenne des cellulesensemencées sur le dessous de la membrane ($n=3$) Les cellules ont étéensemencées à $181'800$ cellules/cm²

Les deux monitorages sont très similaires. Il n'est constaté qu'une légère tendance à des valeurs de TEER supérieures pour les cellulesensemencées au-dessus de la membrane. Une fois que la capacitance de la couche cellulaire C_{cl} tombe, il y a une latence de 2-3 heures avant que le TEER ne commence à augmenter. Les valeurs de la capacitance de la couche cellulaire suivent la même tendance pour les deux conditions et stagnent à un plateau de $2\mu\text{F}/\text{cm}^2$. Pour unensemencement de $242'200$ cellules/cm², il faut cinq jours pour atteindre un plateau de $4'000 - 4'500$ Ohms*cm².

Afin de caractériser la barrière formée par les cellulesensemencées sur et sous la membrane de l'insert, un test de perméabilité a été effectué avec du Jaune lucifer sur une heure d'expérience. Le Jaune Lucifer a été ajouté dans la chambre supérieure soit le compartiment tubulaire. Les valeurs obtenues ont été traitées (Annexe 8.5) et des coefficients de perméabilité ont été calculés. La figure 23 présente les coefficients de perméabilité pour les cellulesensemencées sur et sous la membrane de l'insert.

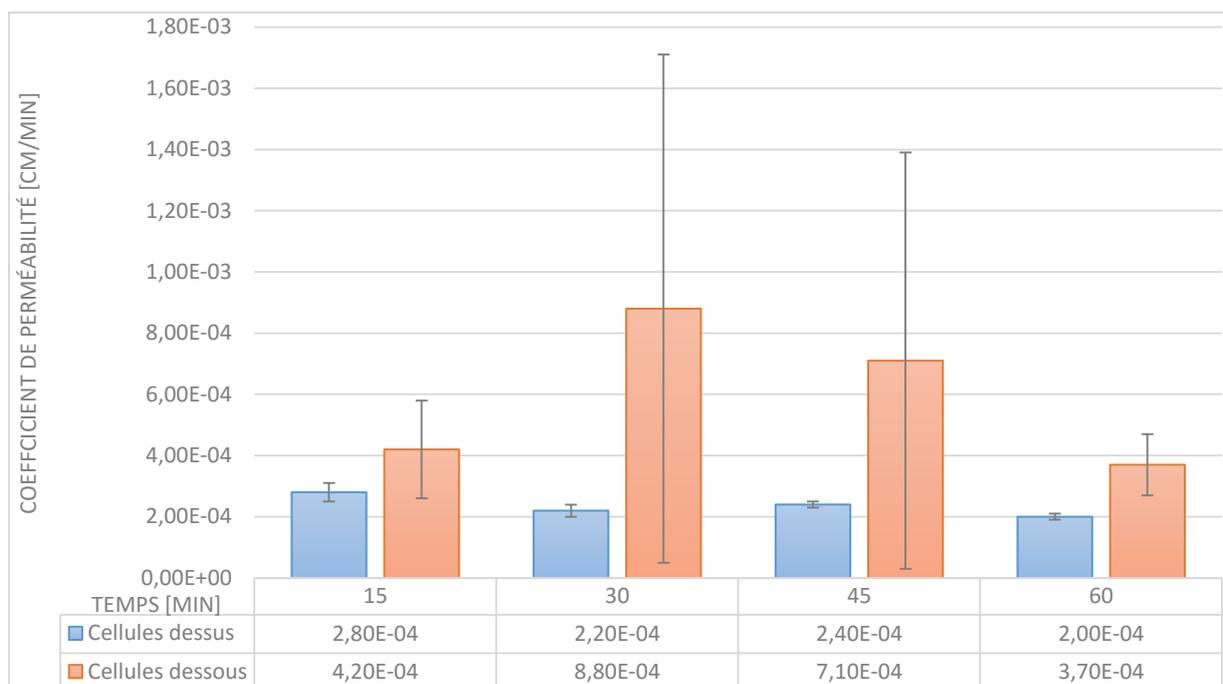


Figure 23 Résultats du test de perméabilité au Jaune lucifer. Les barres présentent les écart-types, $n=3$.

Lorsque les cellules sont ensemencées sur la membrane, les coefficients de perméabilité sont statistiquement les mêmes que lorsqu'elles sont ensemencées sous la membrane. Après 60 minutes, le coefficient de perméabilité est quant à lui statistiquement plus petit quand elles sont ensemencées sur la membrane. Lorsque les cellules sont au-dessus, il est constaté que plus l'expérience avance dans le temps plus le coefficient de perméabilité diminue. Les coefficients de perméabilité des cellules sous la membrane suivent la même tendance à part pour le premier temps où celui-ci est plus faible.

La suite de la caractérisation se voit l'objet d'un immuno-marquage d'un type de jonctions serrées, les jonctions ZO-1. Pour mettre en évidence la présence d'une barrière, un grand nombre de ces jonctions doivent être visibles. La figure 24 ci-dessous montre l'immuno-marquage d'un anticorps dirigé contre les jonctions serrées ZO-1.

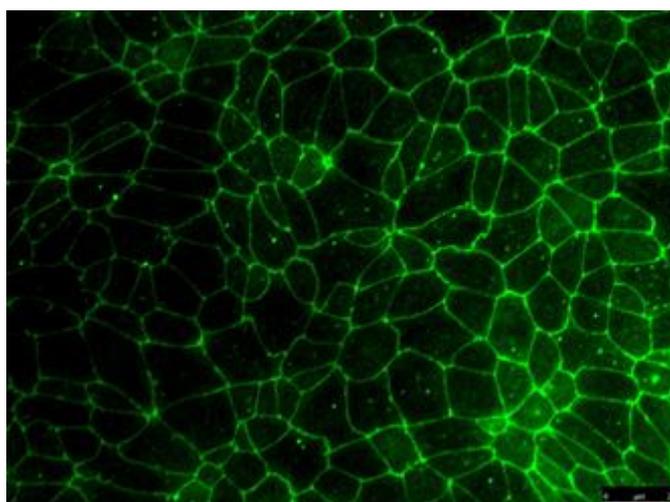


Figure 24 Immuno-marquage sur les jonctions serrées ZO-1 des cellules MPK; Echelle 75 μm

Les jonctions serrées sont visibles sur le tapis cellulaire. Celles-ci sont intactes et contournent toutes les cellules présentes dans l'objectif, car il s'agit d'un marquage membranaire. L'immuno-marquage a très bien fonctionné et révèle la monocouche qui, dans ce cas, atteint le stade de barrière.

Le nombre de cellulesensemencées sur un insert peut avoir une influence sur la montée du TEER des cellules. Le protocole fourni pour les cellules MPK ordonne d'ensemencer 200'000 cellules par insert de 1.12 cm² soit 178'600 cellules/cm² [Annexe 8.2]. Les cellules ont été initialementensemencées avec un nombre allant de 50'000 cellules à 350'000 cellules par insert (44'600 à 312'500 cellules/cm²). Le monitoring est montré à la figure 25 ci-dessous.

avg2 - 50'000 [A1 A2] avg3 - 100'000 [A4] avg4 - 150'000 [A5 A6] avg5 - 200'000 [B1 B2] avg6 - 250'000 [B3 B4] avg7 - 300'000 [B5 B6] avg8 - 350'000 [C1 C2]
avg19 - Blanc [C3 C4]

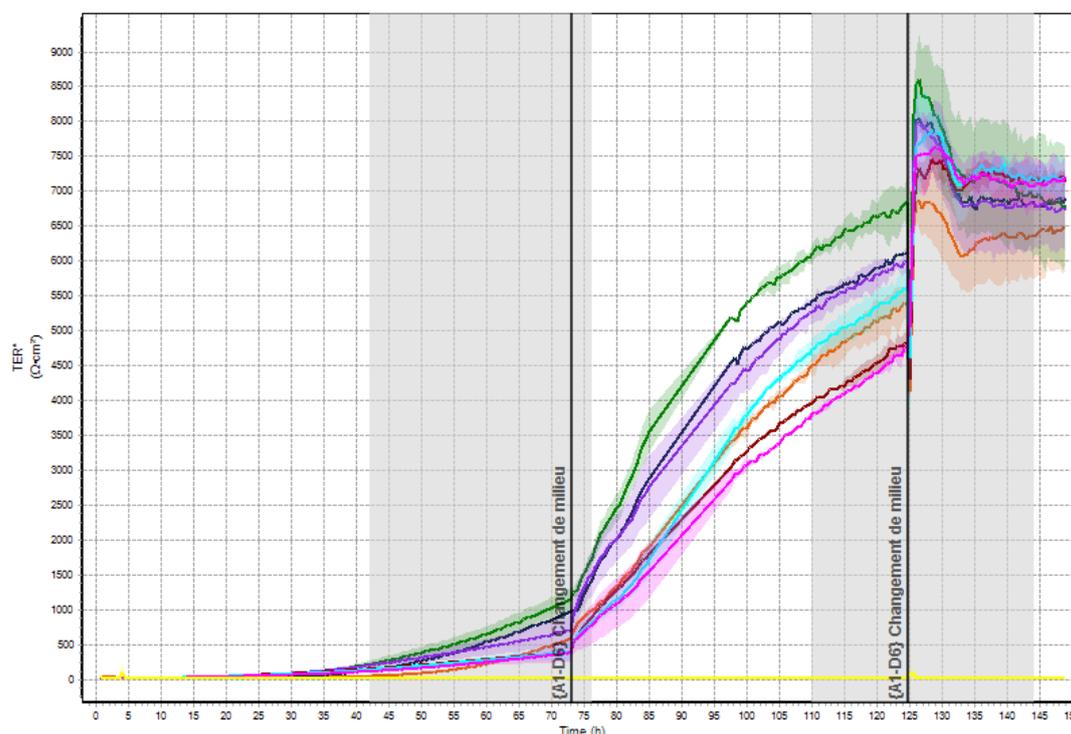


Figure 25 Monitoring entre des cellules initialementensemencées à des nombres différents; ligne orange: 44'600 cellules/cm²; ligne noire: 89'300 cellules/cm²; ligne verte: 133'900 cellules/cm²; ligne violette: 178'600 cellules/cm²; ligne brune: 223'200 cellules/cm²; ligne cyan : 267'800 cellules/cm²; ligne rose : 312'500 cellules/cm²; ligne jaune : Blanc (Chaque condition : n=2)

Les différentsensemencements ont un effet sur la montée du TEER. Il est donc remarqué que si trop de cellules sontensemencées, la formation de la barrière est réduite. De même si trop peu de cellules sontensemencées, cette même formation sera plus lente. Il y a donc un nombre idéal de cellulesensemencées pour obtenir une montée de TEER optimale. L'ensemencement optimal est de 150'000 cellules par insert (133'900 cellules/cm²). Après 6 jours de culture, toutes les conditions de culture arrivent à un même plateau de 7'000 ± 200 Ohms*cm², sauf pour le plus petitensemencement qui atteint 6'500 Ohms*cm².

Le milieu de culture des cellules MPK contient du sérum. Un monitoring de cellules MPK cultivées dans un milieu avec ou sans sérum pour voir si le sérum a une influence sur le TEER. La figure 26 montre les deux monitorages.

— avg2 - Milieu avec sérum Membrane PC [A3 A4] — avg3 - Milieu sans sérum Membrane PC [A5 A6]

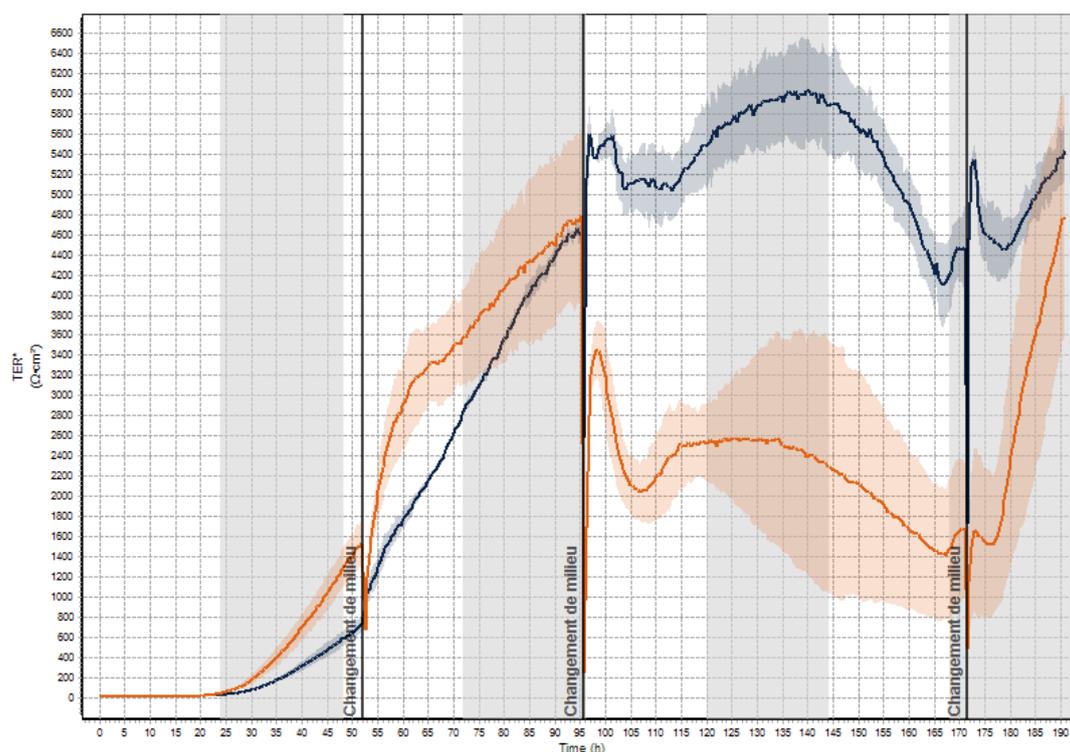


Figure 26 Monitoring sur des cellules MPK ensemencées à $178'600$ cellules/cm² incubée en milieu avec et sans sérum (N=1); ligne noire: moyenne des cellules cultivées dans du milieu avec sérum (n=2) ; ligne orange: moyenne des cellules cultivées dans du milieu sans sérum (n=2);

Les cellules cultivées dans un milieu sans sérum ont une valeur de TEER qui augmente plus fortement initialement que les cellules cultivées dans du milieu avec sérum. Jusqu'au deuxième changement de milieu, les valeurs atteignent une valeur similaire. Après le deuxième changement de milieu, le TEER chute pour les cellules cultivées sans sérum. Les cellules cultivées avec sérum atteignent un plateau dépassant les $5500 \text{ Ohms} \cdot \text{cm}^2$.

L'expérience a été répétée afin de valider les résultats et le monitoring N=2 est présenté à la figure 27.

— avg1 - Milieu avec sérum Membrane PET [B1 B2] — avg2 - Milieu sans sérum Membrane PET [B4 B3]

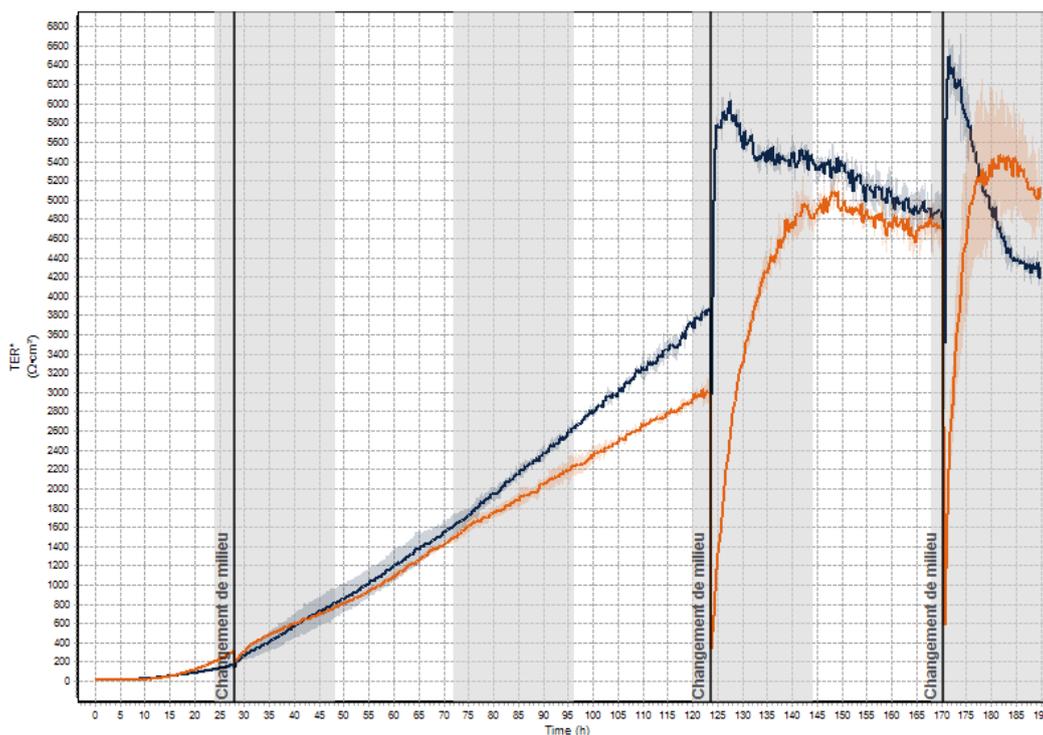


Figure 27 Monitoring sur des cellules MPK ensemencées à 178'600 cellules/cm² incubée en milieu avec et sans sérum (N=2); ligne noire: moyenne des cellules cultivées dans du milieu avec sérum (n=2) ; ligne orange: moyenne des cellules cultivées dans du milieu sans sérum (n=2)

Les résultats du deuxième monitoring montrent que les cellules cultivées avec sérum ont cette fois-ci une montée de TEER plus élevée dès le départ. La valeur de TEER est toujours plus élevée pour les cellules avec sérum. Cependant après un troisième changement de milieu, les cellules sans sérum ont une forte chute de la valeur de TEER mais une très forte remontée aussi allant jusqu'à dépasser la valeur de TEER des cellules avec sérum et atteignant environ 5'000 Ohms*cm² tandis que les cellules avec sérum sont à 4'500 Ohms*cm². Il faut noter que les deux premiers monitorages diffèrent en un point, les membranes des inserts ne sont pas les mêmes. Effectivement pour le premier monitoring, la membrane est en polycarbonate (PC) et pour le deuxième, en polyester (PET). Un troisième monitoring est nécessaire avec une même membrane que le deuxième afin de valider l'effet du sérum sur les cellules. Le monitoring est présenté en figure 28.

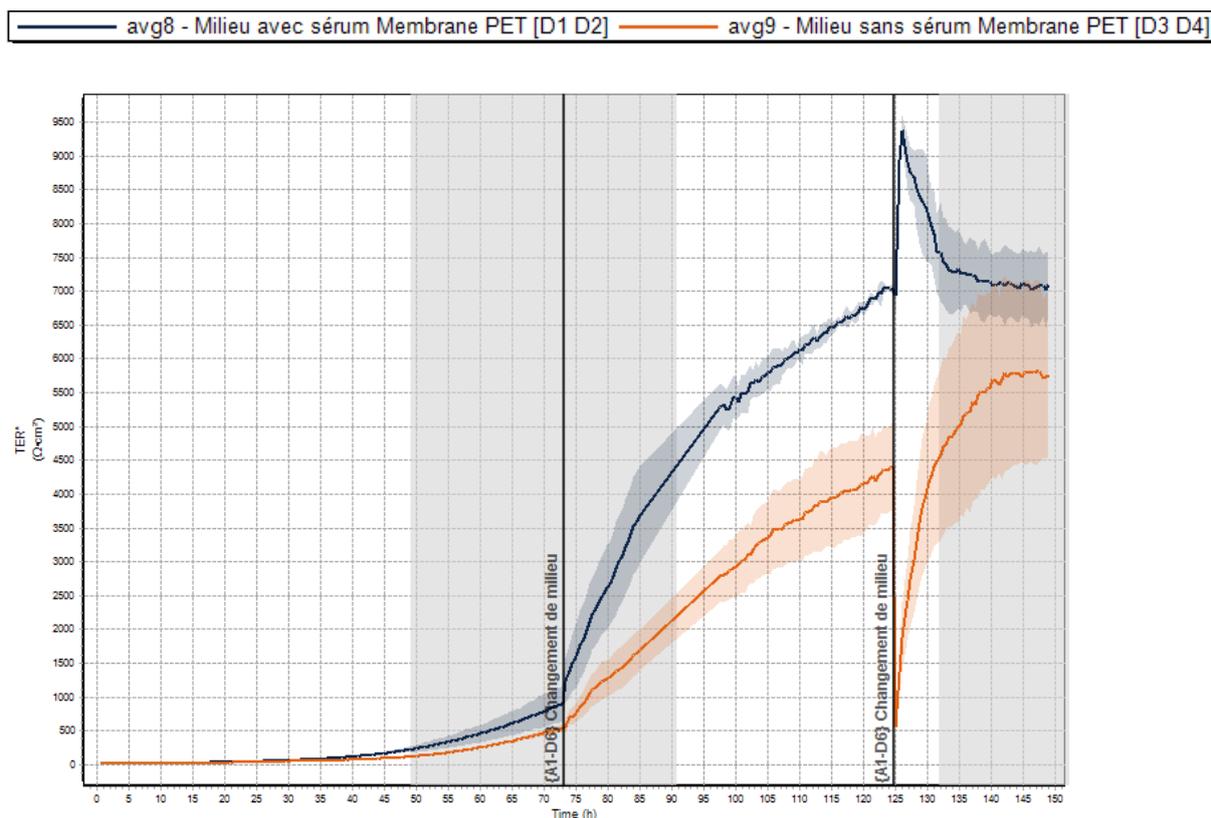


Figure 28 Monitoring sur des cellules MPK ensemencées à 178'600 cellules/cm² incubée en milieu avec et sans sérum (N=3); ligne noire: moyenne des cellules cultivées dans du milieu avec sérum (n=2) ; ligne orange: moyenne des cellules cultivées dans du milieu sans sérum (n=2)

Les résultats indiquent que le milieu avec sérum provoque une montée de TEER plus rapide que celui sans sérum. Les valeurs de TEER sont tout au long du monitoring plus élevées lorsque la barrière est en présence de sérum. Le plateau est atteint après 5-6 jours de culture et celui atteint 7'000 Ohms*cm² pour le milieu sans sérum contre environ 5'800 Ohms*cm² pour le milieu sans sérum. Il est remarqué deux effets contraires lors du changement de milieu. Pour un milieu avec sérum, les cellules ont un TEER brusquement plus élevé et celui-ci diminue par la suite. Pour un milieu sans sérum, l'inverse est visible. Après le changement de milieu, une chute drastique du TEER est observée mais une remontée importante de celui-ci vient par la suite.

Les inserts contiennent des membranes de différentes porosités et ces membranes peuvent être fabriquées en différents matériaux comme vu précédemment. Les matériaux peuvent avoir une influence sur le TEER et l'expérience suivante (Figure 29) montre la différence dans un monitoring entre des cellules ensemencées sur une membrane en polyester (PET) et une membrane en polycarbonate (PC). Les deux membranes ont une porosité de 0.4 µm.

— avg2 - Milieu avec sérum Membrane PC [A3 A4] — avg1 - Milieu avec sérum Membrane PET [A1 A2]

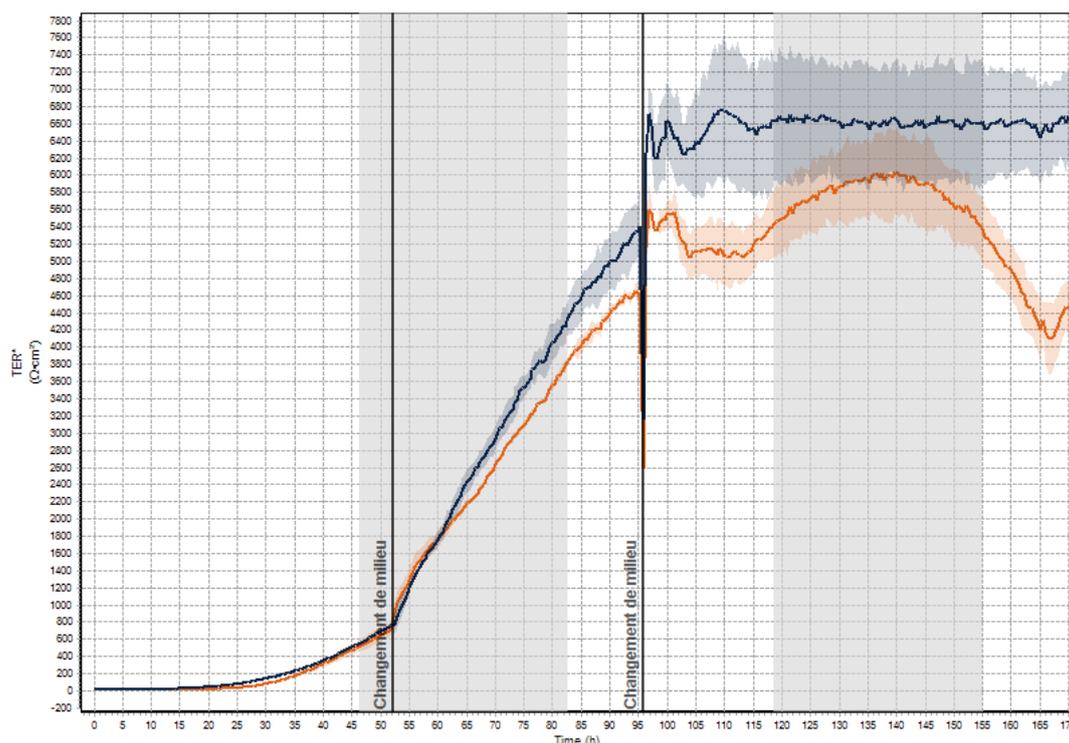


Figure 29 Monitoring entre des cellulesensemencées à 178'600 cellules/cm² sur une membrane de PET et une membrane de PC; ligne orange: moyenne membrane en PET (n=2); ligne noire: moyenne membrane en PC (n=2)

Les cellules obtiennent des valeurs de TEER plus élevées lorsqu'elles sontensemencées sur une membrane en PET. Une fois atteint le plateau de 6500 Ohms*cm², le plateau reste stable pour la membrane en PET alors que pour la membrane en PC, une phase de déclin est observée. Les membranes en PC ont une opacité que les membranes en PET n'ont pas. Les cellules ne sont pas visibles sur les membranes en PET.

3.2. Fluidique dans la chambre supérieure

Comme la présence d'un flux est très importante pour l'imitation des microenvironnements *in vivo*, il faut caractériser celui-ci et décider de la façon dont il est appliqué sur les cellules. Premièrement, un flux venant de la partie apicale a été testé. La figure 30 présente la méthode utilisée pour cette expérience.

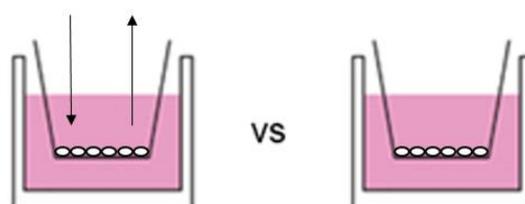


Figure 30 Schéma de la fluidique supérieure par rapport à une culture sans fluidique (→ sens du flux)

Grâce à un système de fluidique (Figure 18A) contenant une pompe péristaltique, un émetteur Wi-Fi et une batterie, le dispositif a pu être contrôlé par une application permettant de choisir la vitesse de rotation de la pompe. Le débit minimal a été choisi soit 55.4 μ L/min. Deux inserts ont étéensemencés soit un (insert 1) en contact de la fluidique et un (insert 2) sans fluidique. Le monitoring a été effectué par Millicell et l'imagerie par microscope. L'insert 1 a été mis en condition statique, soit sans fluidique,

après 48 heures de culture tandis que l'insert 2 a été mis sous condition fluide comme le décrit la figure 31.

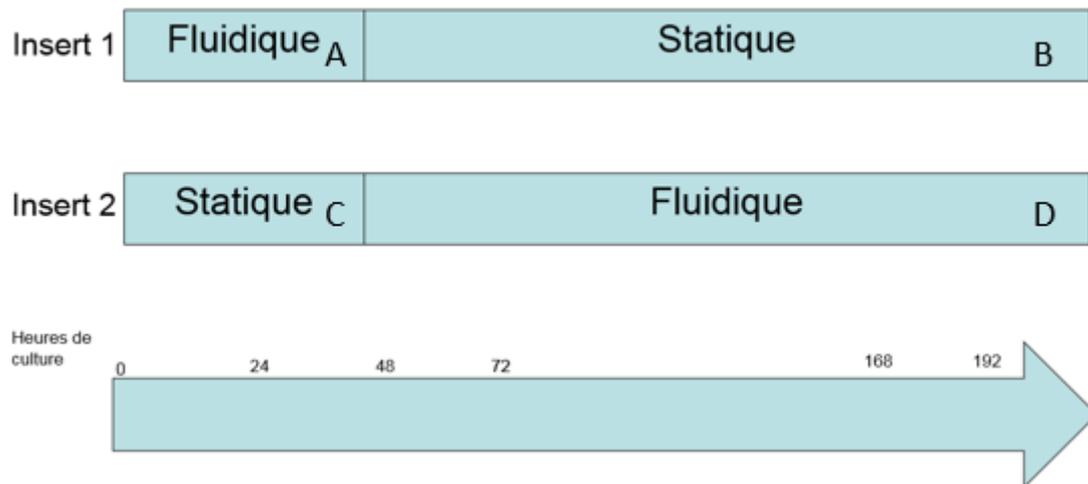


Figure 31 Schéma présentant la méthode de culture des inserts 1 et 2 sous condition avec ou sans fluide.

Il s'agit d'une inversion des conditions de culture pour chaque insert. La figure 32 montre les conséquences qu'ont les deux conditions de cultures sur les cellules.

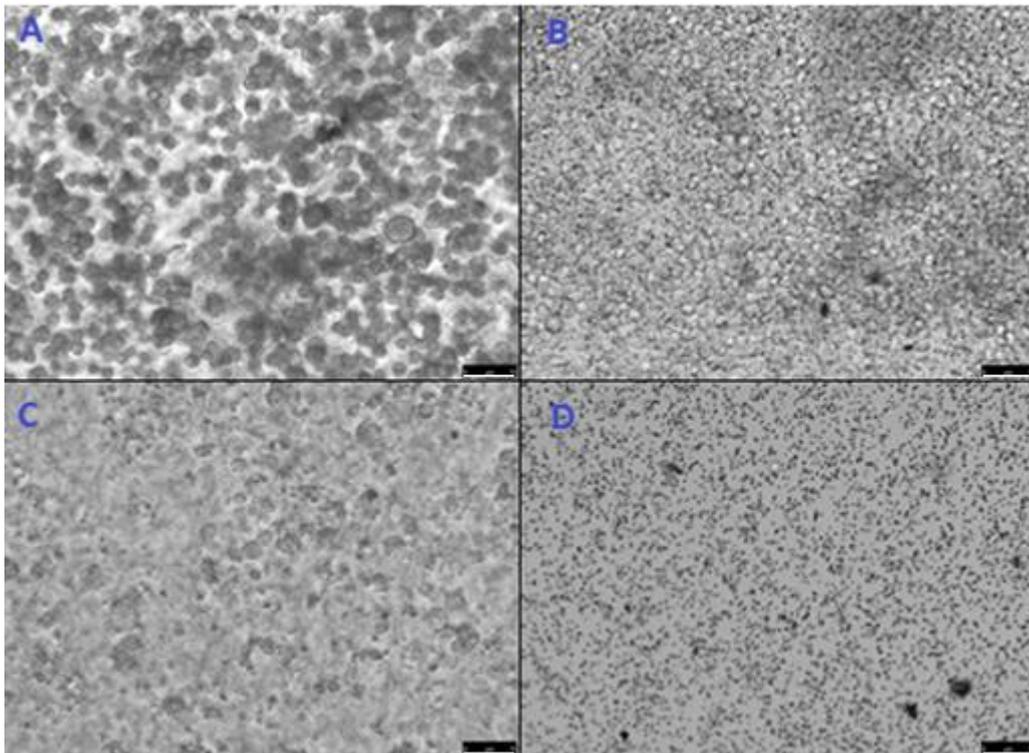


Figure 32 Images des cellules MPK durant l'expérience de fluide supérieure
 (A) Cellules MPK cultivées sous fluide supérieure durant 48h (insert 1) ; (B) Cellules MPK de l'insert 1 cultivées durant 144h de manière statique après inversion des inserts ; (C) Cellules MPK cultivées de manière statique durant 48h (insert 2) ; (D) Cellules MPK de l'insert 2 cultivées durant 144h sous fluide supérieure après inversion des inserts; Echelle 75 µm

Les cellules se décollent les unes des autres après 2 jours de culture sous flux (Figure 32A), tandis qu'elles ont une bonne croissance dans les conditions statiques (Figure 32C). Après inversion des inserts, les cellules initialement sous flux n'ont presque pas de croissance (Figure 32B) après 6 jours de culture.

Les cellules initialement sous conditions statiques, misent ensuite sous flux n'ont pas survécu (Figure 32D).

Pour mettre en évidence la mortalité des cellules, un test de viabilité (Calcéine/PI/Hoechst) a été effectué en toute fin de culture sur les inserts 1 et 2 et est présenté aux figures 33 et 34.

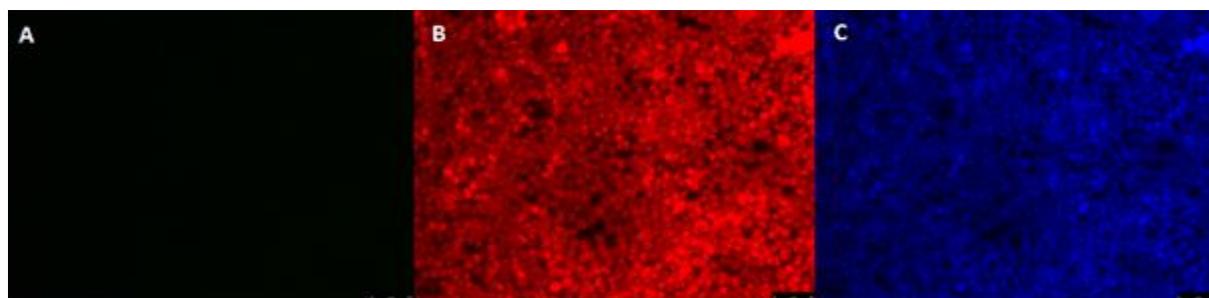


Figure 33 Test de viabilité sur l'insert 1 (A) Calcéine ; (B) Iodure de propidium ; (C) colorant Hoechst ; Echelle 75 μ m

Pour l'insert 1, aucune cellule n'a été colorée par la calcéine synonyme de cellule vivante (Figure 33A). Toutes les cellules ont été colorées par l'iodure de propidium qui colore les cellules mortes (Figure 33B). Le contrôle du Hoechst et les noyaux de chaque cellule ont été colorés (Figure 33C).

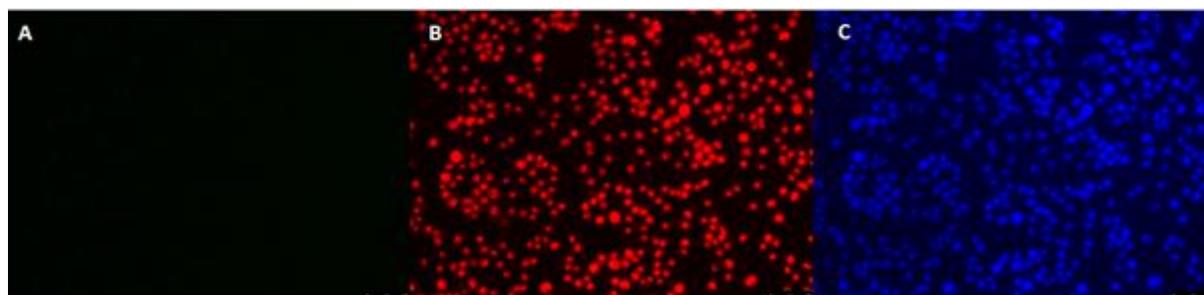


Figure 34 Test de viabilité sur l'insert 2 (A) Calcéine ; (B) Iodure de propidium ; (C) colorant Hoechst ; Echelle 75 μ m

Pour l'insert 2, le résultat est strictement identique à l'insert 1, soit aucunes cellules colorées par la calcéine, mais toutes par l'iodure de propidium.

3.3. Fluidique dans la chambre inférieure

Après avoir testé le flux sur la partie apicale, la présence d'un flux du côté basolatéral des cellules a été mis en œuvre. Les cellules ont étéensemencées sur et sous la membrane des inserts et divers conditions (cellules sur l'insert statiques ; cellules sous l'insert statiques ; cellules sur l'insert sous flux ; cellules sous l'insert sous flux) présentées à la figure 35 ont été testées.

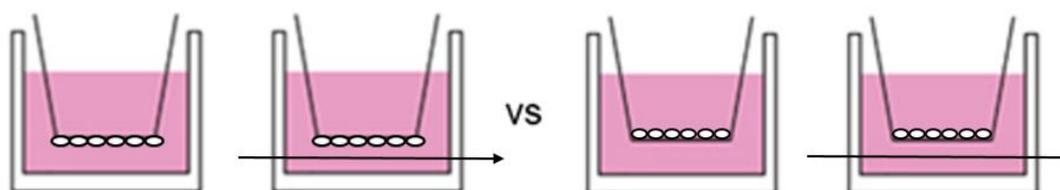


Figure 35 Schéma des cultures avec cellules MPK ensemencées sur et sous la membrane de l'insert avec de la fluidique inférieure par rapport à des cultures sans fluidiques (\rightarrow sens du flux)

De même que pour la fluidique venant du compartiment supérieur, la fluidique provenant du compartiment inférieur a nécessité un système (Figure 18B) contenant une pompe péristaltique, un émetteur Wi-Fi, une batterie et un support. Le dispositif a pu être contrôlé par l'application PMI

permettant de choisir la vitesse de rotation de la pompe. Le débit minimal de la pompe a été choisi soit 516 $\mu\text{L}/\text{min}$. Deux inserts de chaque condition ont été ensemencés et monitorés par mesure de TEER grâce au Millicell. Les résultats obtenus après plusieurs jours sont présentés dans les figures 36 et 37 ci-dessous.

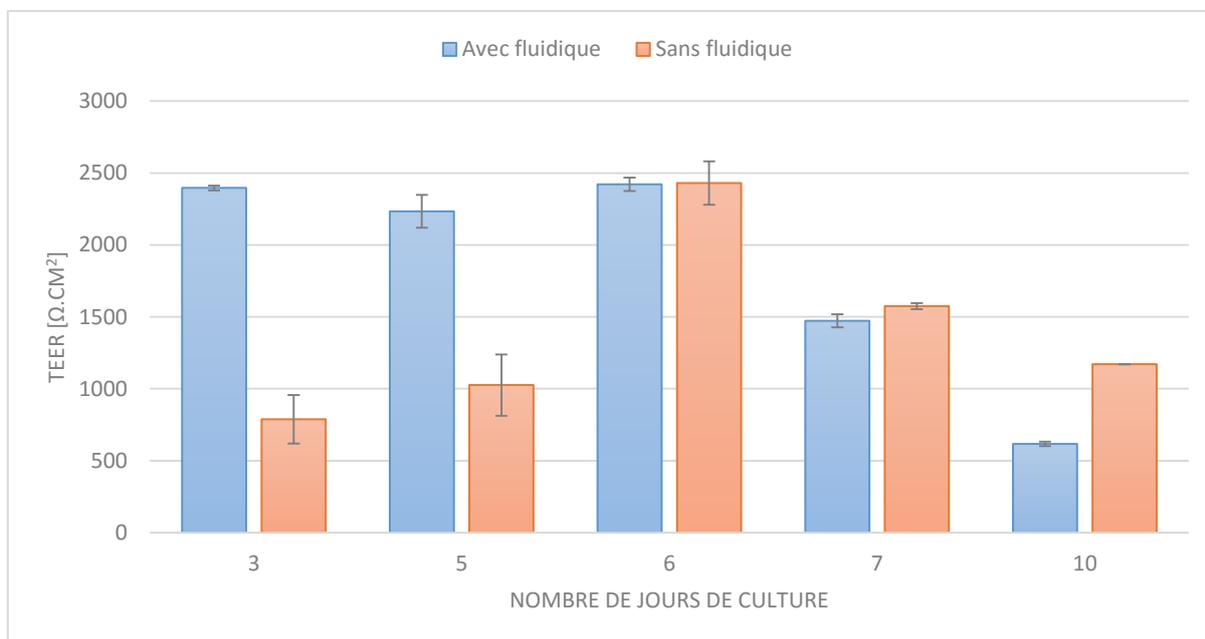


Figure 36 Monitoring des cellules MPK ensemencées **sur** la membrane avec le Millicell avec et sans fluide provenant du compartiment inférieur ; en bleu : culture des cellules **sur** la membrane avec fluide (n=2); en orange : culture des cellules **sur** la membrane sans fluide (n=2); Jour 6 : Début de la fuite de milieu ; Les barres d'erreur sont les écart-types

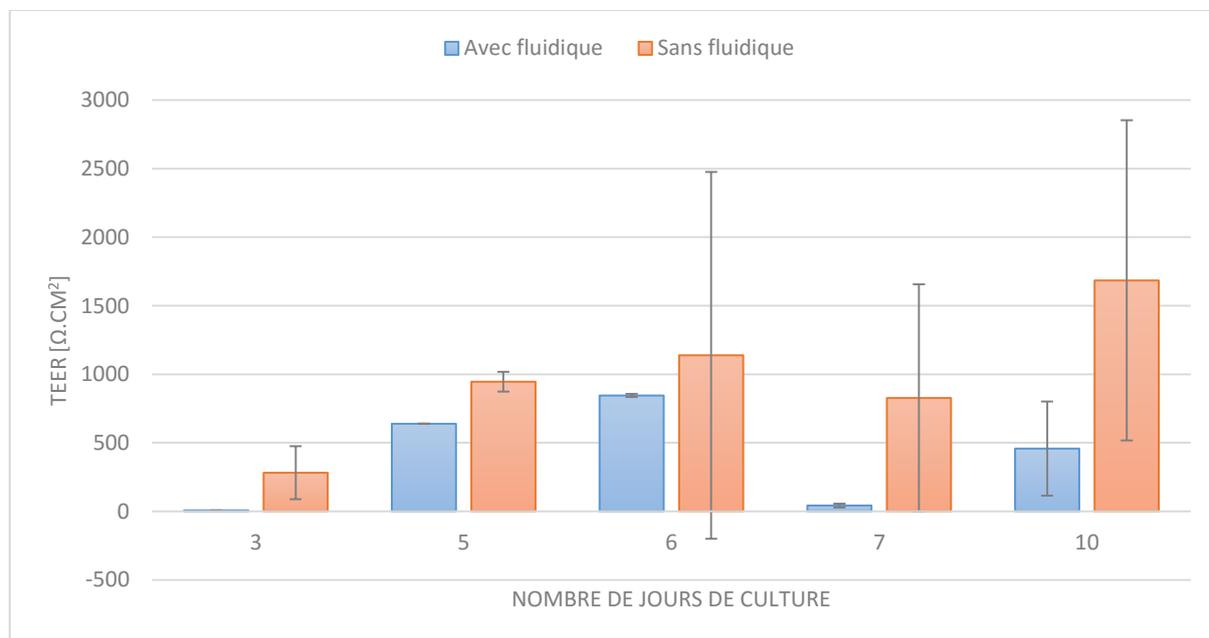


Figure 37 Monitoring des cellules MPK ensemencées **sous** la membrane avec le Millicell avec et sans fluide provenant du compartiment inférieur ; en bleu : culture des cellules **sous** la membrane avec fluide (n=3); en orange : culture des cellules **sous** la membrane sans fluide (n=3); Jour 6 : Début de la fuite de milieu ; Les barres d'erreur sont les écart-types

Généralement, les cellules ensemencées sur la membrane ont un TEER plus élevé que celles ensemencées sous la membrane. Pour les mesures des cellules étant sous la membrane, les cellules en condition statique ont un TEER un peu plus élevé que les cellules sous flux mais suivent la même tendance. Le débit du flux peut en être la cause. Pour les mesures de cellules étant sur la membrane,

une forte différence est constatée dès le départ. En effet les cellules étant en présence de flux ont un TEER beaucoup plus élevé que les cellules en condition statique les cinq premiers jours. La valeur de TEER des deux conditions se rejoint après 6 jours de culture. A partir du 6^{ème} jour de culture, une nette diminution du TEER est visible globalement et ceci est dû à une fuite du milieu entre la plaque de culture et le plexiglas. L'expérience n'est donc pas représentative à partir de ce jour-ci. Les écart-types sont très grand, car comme mentionné précédemment, les valeurs mesurées par le Millicell fluctuent beaucoup du fait de la non-reproductibilité des mesures.

3.4. Validation du Cellware Hepia

La validation du Cellware Hepia par rapport à un instrument déjà sur le marché (CellZscope) est très importante, afin d'obtenir des résultats similaires ou meilleurs. Un premier monitoring (N=1) en parallèle des deux instruments de mesure du TEER a été effectué sur des cellules MPK. Les cellules ont été cultivées, ensemencées dans les mêmes conditions. Le volume de milieu basolatéral et apical était similaire ainsi que la fréquence des mesures. La figure 38 montre le monitoring des deux appareils.

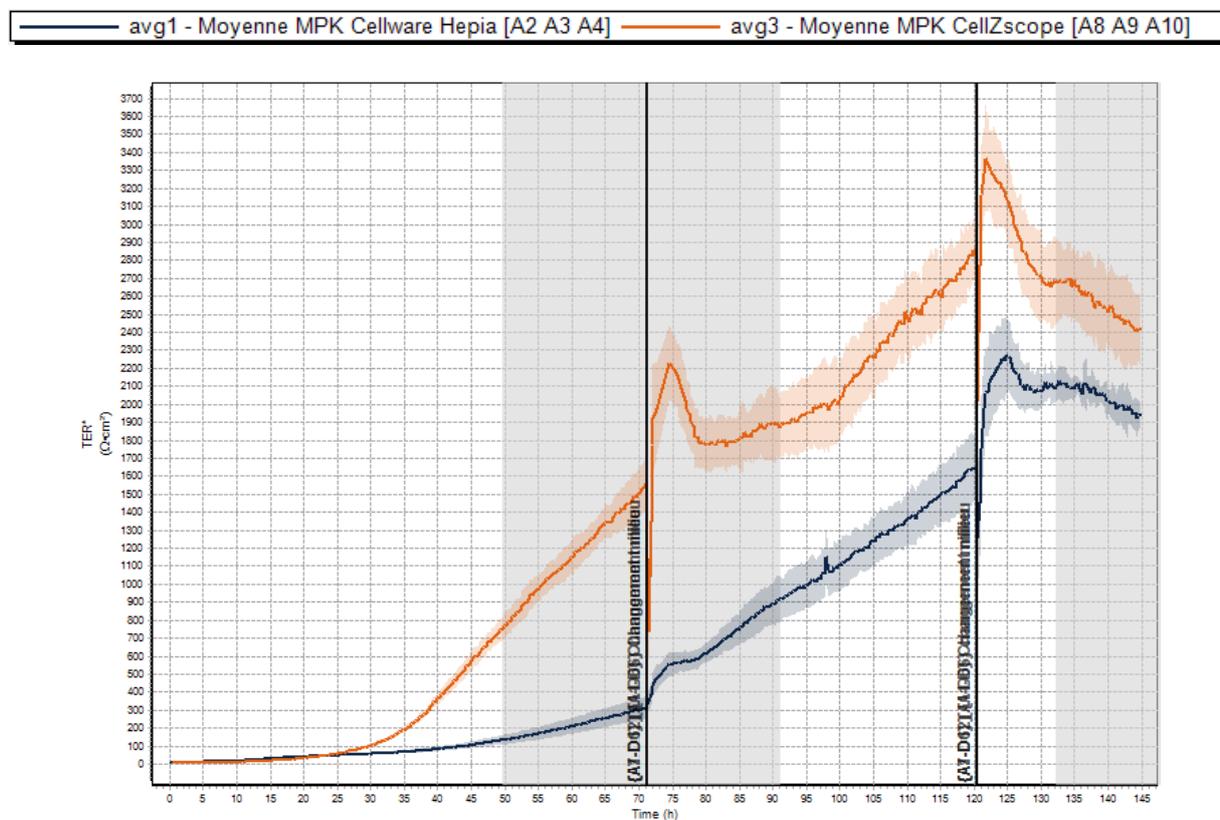


Figure 38 Monitoring du TEER sur une semaine (N=1) sur des cellules MPK avec Cellware Hepia et CellZscope ; Ligne rouge : moyenne des cellules ensemencées et mesurées dans le CellZscope (n=3) ; Ligne noire : moyenne des cellules ensemencées et mesurées dans le Cellware Hepia (n=3) ; Ensemencement 242'400 cellules/cm²

Les cellules cultivées dans le Cellware Hepia ont un retard sur la montée du TEER par rapport au CellZscope. Les valeurs de TEER sont significativement moins élevées durant tout le monitoring. La tendance est la même dans les deux appareils mais avec une différence de TEER de l'ordre de 800 – 1000 Ω*cm². En termes de capacitance, les deux appareils sont significativement semblables.

Un deuxième monitoring (N=2) des cellules MPK sur les deux appareils en parallèle a été effectué, toujours dans les mêmes conditions afin de valider les résultats obtenus préalablement (Figure 38). Le résultat est montré sur la figure 39.

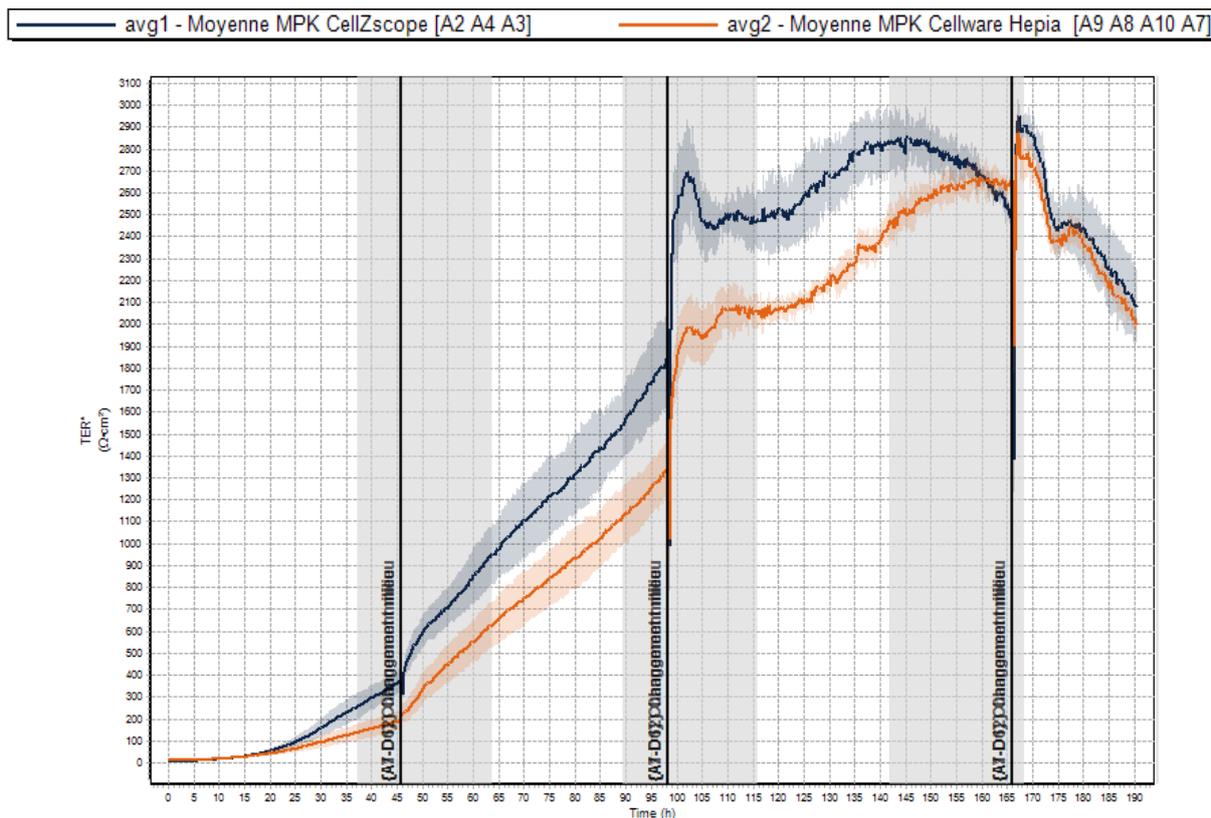


Figure 39 Monitoring de la TEER sur une semaine (N=2) sur des cellules MPK avec Cellware Hepia et CellZscope ; Ligne rouge : moyenne des cellules ensemencées et mesurées dans le CellZscope (n=3) ; Ligne noire : moyenne des cellules ensemencées et mesurées dans le Cellware Hepia (n=3) ; Ensemencement 242'400 cellules/cm²

Les courbes, soit la formation de jonctions serrées entre les cultures cultivées dans le Cellware Hepia ou dans le Cellware CellZscope sont semblablement similaires. Un léger décalage de la valeur de TEER est observé durant phase montante. Le plateau atteint, soit la valeur maximale de TEER des cellules est le même dans les deux appareils. Les résultats obtenus pour le deuxième monitoring sont meilleurs que ceux obtenus pour le premier monitoring (Figure 38).

Cette constante différence entre les deux Cellware amène à dire que les cellules poussent moins bien dans le Cellware Hepia. Afin de vérifier si les composants principaux de cet appareil ne présentaient aucun danger pour les cellules, un test de biocompatibilité a été effectué. La colle EPO-TEK® et le scotch 467MP 200MP Adhesive ont été testés. La figure 40 présente la croissance cellulaire après 4 jours de croissance en présence des composants.



Figure 40 Test de biocompatibilité sur les composants du Cellware Hepia (A) Croissance cellulaire sur la colle EPO-TEK® de chez EPOXY TECHNOLOGY après 4 jours ; (B) Croissance cellulaire sur le scotch 3M 467MP 200MP Adhesive après 4 jours ; (C) Croissance cellulaire contrôle après 4 jours ; Ensemencement 114'300 cellules/cm² ; Echelle 75 µm

Les cellules incubées normalement sans composant (Figure 40C) forment une monocouche et il y a peu de cellules mortes. Les cellules incubées avec les deux composants (Figure 40A et 40B) sont similaires au contrôle et montrent une bonne croissance cellulaire, ainsi que peu de cellules mortes comme le montre la figure 41. La constante diminution de la valeur du TEER du Cellware Hepia par rapport au CellZscope (Figure 38) ne vient donc pas d'un manque de biocompatibilité de ces deux composants.

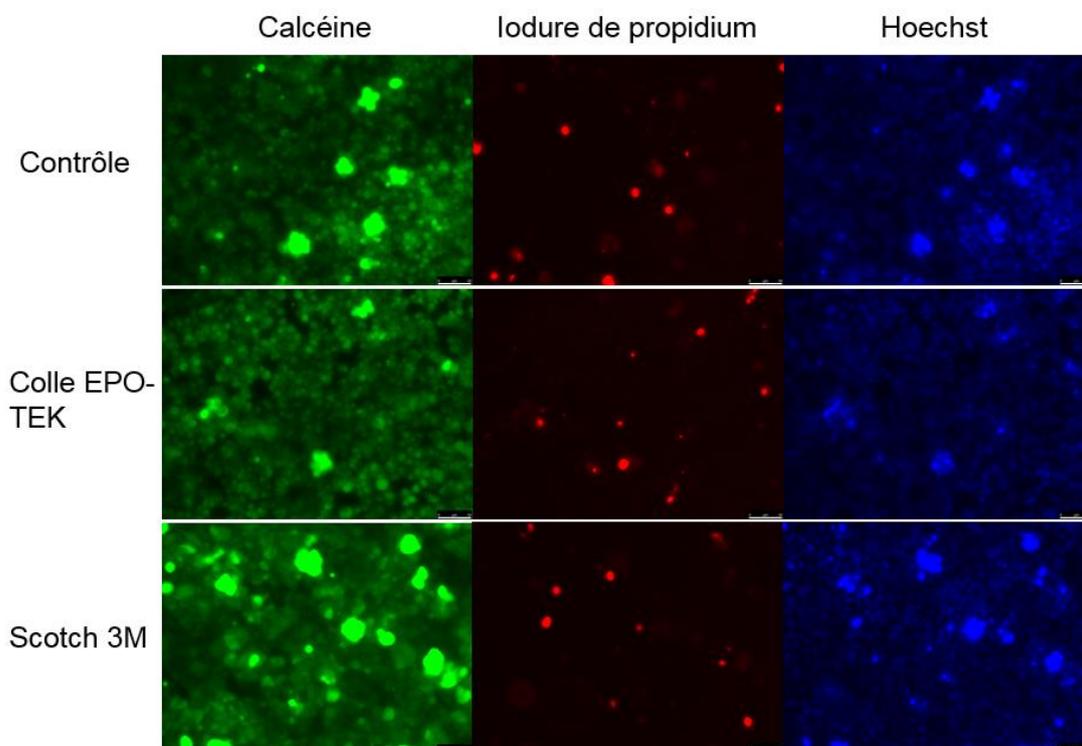


Figure 41 Test de viabilité sur les composants du Cellware Hepia : colle EPO-TEK® de chez EPOXY TECHNOLOGY et scotch 3M 467MP 200MP Adhesive après 4 jours ; Ensemencement 114'300 cellules/cm² ; Echelle 75 µm

Une même question s'est posée sur les composants permettant la conductivité électrique, soit les plots en inox reliant l'électrode du bas au circuit électrique et les connecteurs plaqués or. Ceux-ci ont été placés un mois dans du milieu de culture à 37°C, 5% CO₂ sans agitation afin de voir l'influence de l'humidité sur ces deux composants. La figure 42 montre le résultat après un mois.

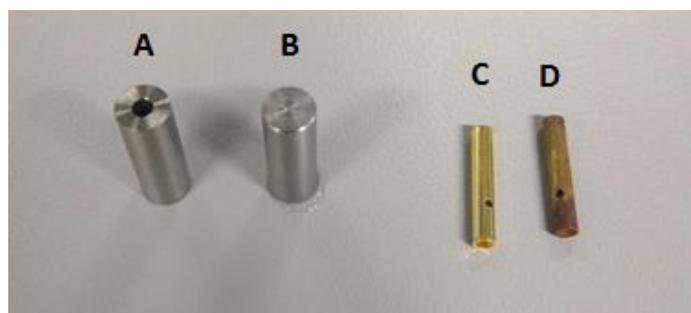


Figure 42 Résultats de l'incubation dans du milieu de culture de deux composants permettant la conductivité électrique : (A) Plot neuf ; (B) Plot incubé dans le milieu ; (C) Connecteur plaqué or neuf ; (D) Connecteur plaqué or incubé dans le milieu

Le plot en acier inoxydable ressort intact après un mois de culture. Ce n'en est pas de même pour le connecteur plaqué or qui ressort très oxydé du milieu de culture. Il a subi une dégradation importante.

La température peut aussi avoir un effet sur la mesure du TEER. Donc les appareils (Cellware Hepia et CellZscope) ont été placés au réfrigérateur durant la nuit, ainsi que le PBS. Les appareils ont ensuite

été placés dans l'incubateur à 37°C, 5% CO₂. Les mesures ont été effectuées toutes les cinq minutes et une prise de température du liquide a été effectuée à chaque mesure. Le tout s'est effectué sans cellules. La figure 43 démontre les résultats obtenus pour les deux différents appareils de monitoring. Les deux appareils ont une capacité de 24 puits pouvant accueillir des inserts de 0.33 cm².

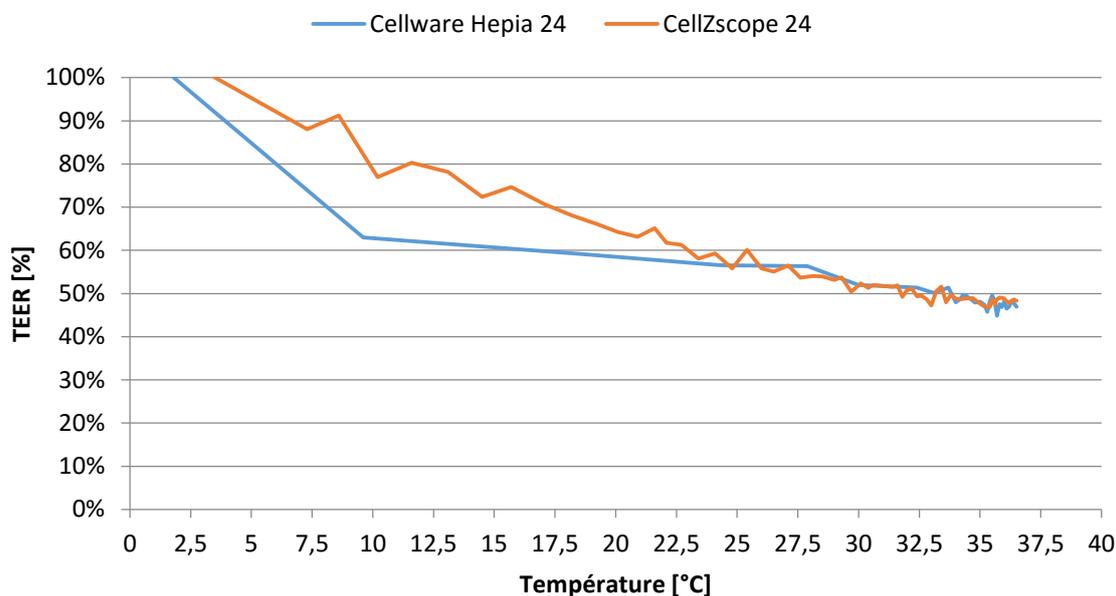


Figure 43 Test de l'effet de la température sur la mesure du TEER dans les deux appareils (Cellware Hepia 24 et CellZscope 24. Les mesures de TEER se sont faites sur du PBS sans cellules.

L'influence de la température sur la valeur du TEER peut être observée. La mesure du TEER sans cellules diminue en fonction de l'augmentation de la température pour les trois appareils. Aux alentours de 37°C, le TEER est quasiment négligeable. Le TEER mesuré en présence d'une monocouche de cellules est réellement la résistance de cette monocouche uniquement. Donc il n'y a aucune influence de d'autres résistances.

Les figures 44 et 45 comparent l'augmentation de température en fonction du temps et la diminution de TEER en fonction du temps pour le Cellware Hepia et pour le CellZscope.

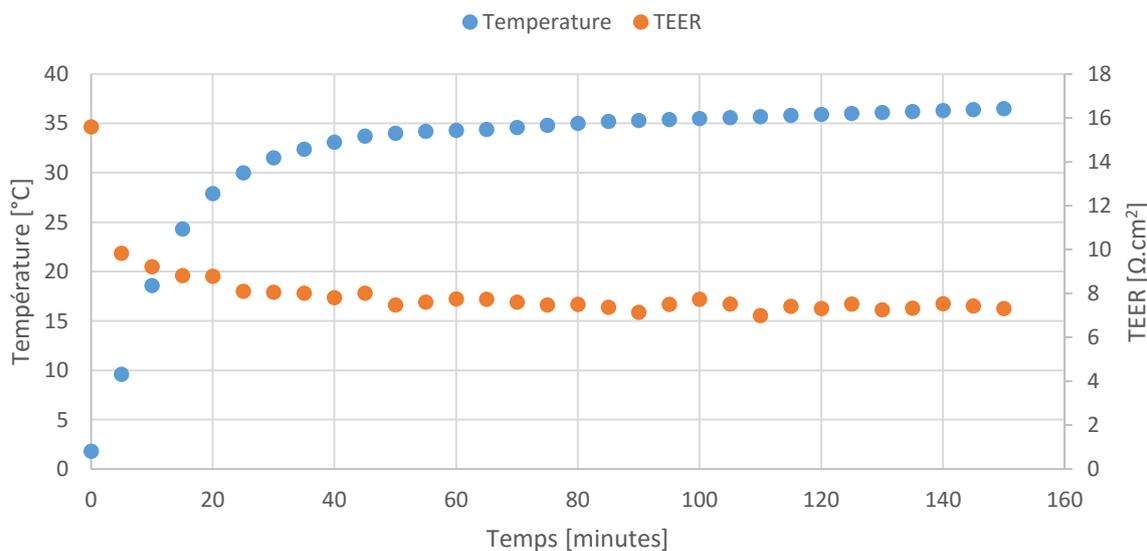


Figure 44 Graphe d'inertie du Cellware Hepia : rapport de la température et du TEER en fonction du temps.

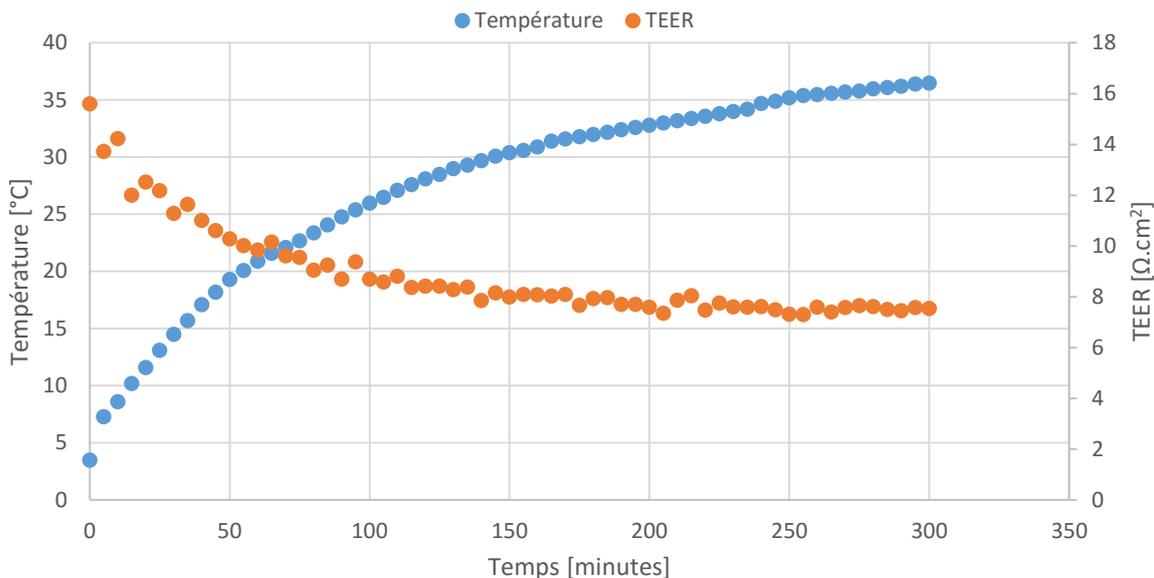


Figure 45 Graphe d'inertie du CellZscope : rapport de la température et du TEER en fonction du temps.

L'inertie des deux appareils est différente. Le Cellware Hepia réagit plus rapidement aux changements de température, alors que le CellZscope met plus de temps à se réchauffer.

Les électrodes sont absolument nécessaires pour mesurer une impédance. De ce fait, la distance entre l'électrode supérieure et l'électrode inférieure ainsi que la surface de ces électrodes sont des paramètres qu'il faut vérifier et valider. Il faut ne pas omettre que les distances entre les électrodes changent, mais d'un appareil à l'autre la position de l'insert n'est pas la même aussi. La conformation de la distance entre les électrodes et la membrane de l'insert est différente que la mesure se fasse dans le CellZscope ou dans le Cellware Hepia comme le démontre la figure 46.

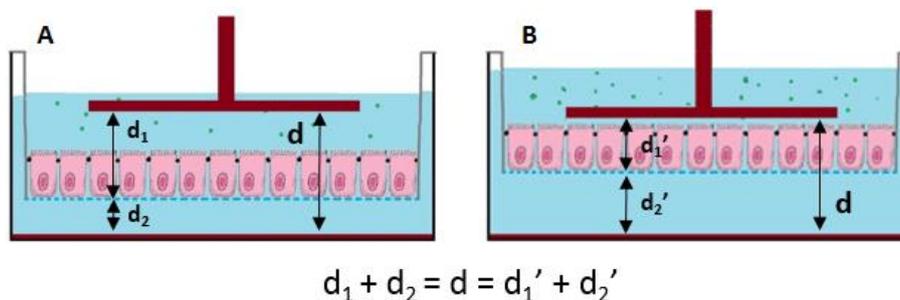


Figure 46 Schéma présentant la différence de conformation entre la distance des électrodes et la membrane de l'insert pour le CellZscope (A) et pour le Cellware Hepia (B).

Une expérience consistant à mesurer la valeur du TEER avec ou sans cellules sur des distances entre les électrodes variant de 6.5 mm à 5.9 mm a été établie. Sachant que la distance entre les électrodes utilisées couramment sur le Cellware Hepia est de 6.5 cm tandis que celle du CellZscope est de 6 cm. Les résultats sont présentés à la figure 47.

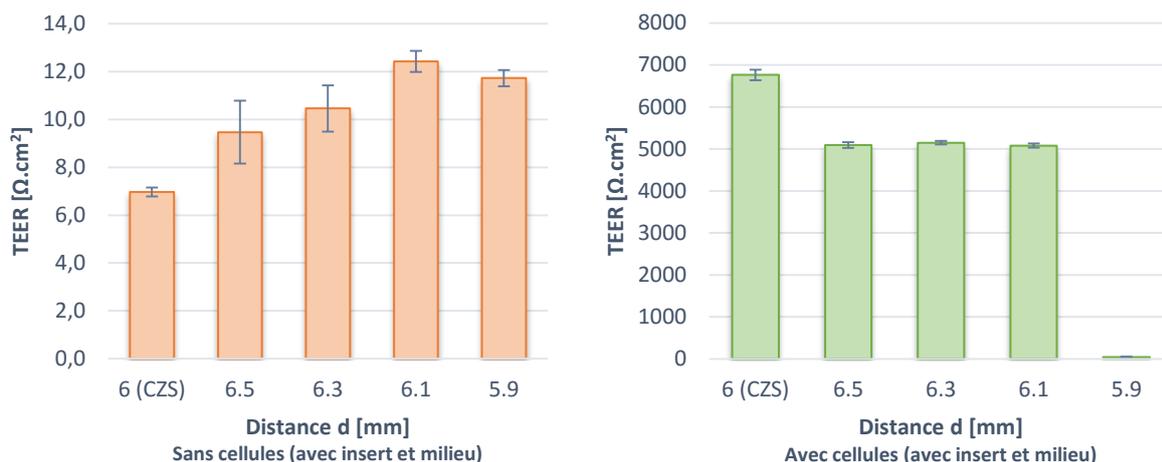


Figure 47 Test des différentes distances entre les électrodes sur le Cellware Hepia; milieu et insert avec ou sans cellules. La première colonne CZS est la mesure sur le CellZscope. Chaque distance a été mesurée à n=3; Les barres d'erreur sont les écart-types.

Pour les mesures sans cellules, les résistances sont semblables que la distance entre les électrodes soit à 6.5 mm ou 5.9 mm. La mesure effectuée par le CellZscope a un TEER un peu moins élevé. Alors que pour les mesures en présence de cellules, les résistances changent. La mesure du CellZscope permet une résistance plus élevée d'environ 1'500 Ohms*cm² que les mesures du Cellware Hepia. Le Cellware quant à lui, que la distance entre les électrodes soit de 6.5 mm ou de 6.1 mm, les résistances sont les mêmes. Par contre, lorsque la distance entre les électrodes est de 5.9 mm (position la plus proche avec le matériel utilisé), une résistance très faible de l'ordre de quelques dizaines de Ohms*cm² est mesurée.

Afin de concevoir des plaques de culture les plus optimisées possible, les ingénieurs ont voulu rendre le fond du puit transparent pour prendre des images. Mais il faut une surface d'électrode inférieure assez grande pour mesurer une résistance. Les électrodes supérieures du Cellware Hepia et du CellZscope mesurent 5.5 mm, respectivement 4.5 mm. Les La figure 48 montre les différents cas de figure.



Figure 48 Schéma présentant les différentes surfaces d'électrodes testées avec le diamètre du trou et la surface effective de l'électrode inférieure.

Une variation de la surface de l'électrode inférieure entre 110 mm² et 180 mm² a été mesurée et les variations de TEER sont visibles à la figure 49.

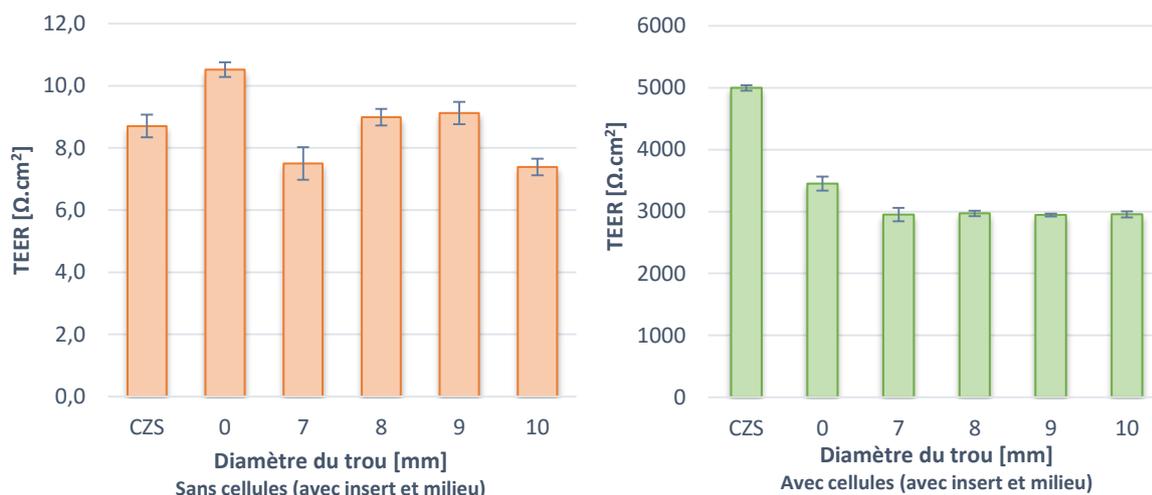


Figure 49 Test des différentes tailles d'électrodes inférieures sur le Cellware Hepia; milieu et insert avec ou sans cellules. La première colonne CZS est la mesure sur le CellZscope. Chaque surface a été mesurée à n=3 ; Les barres d'erreur sont les écart-types.

Pour les mesures sans cellules, les résistances sont moindres et la plus faible est celle perforée avec un trou de 7 mm. Le CellZscope (surface d'électrode inférieure de 134.8 cm²) obtient la même résistance que le Cellware Hepia perforé à 8 mm (surface d'électrode inférieure de 134.4 cm²). Les résistances sont quasiment semblables. Les mesures en présence de cellules démontrent que le CellZscope mesure une résistance plus élevée pour le même insert de l'ordre d'environ 1'500 Ohms*cm² pour une électrode non perforée. L'électrode non perforée du Cellware Hepia mesure quant à lui, une résistance plus élevée d'environ 500 Ohms*cm² qu'une électrode perforée. Peu importe que le trou fasse 7, 8, 9 ou 10 mm, la mesure de la résistance est quasiment semblable.

Une dernière expérience a été effectuée pour valider le Cellware Hepia. Durant une phase de formation de la barrière, le CellZscope mesure toujours des valeurs de TEER plus élevée. Afin de savoir s'il s'agit de l'appareil qui mesure une résistance plus haute ou simplement si c'est la biologie qui parle d'elle-même. Donc les inserts initialement cultivés dans le Cellware Hepia sont passés dans le Cellware CellZscope et inversement pour confirmer valider l'appareil. La figure 50 présente les résultats.

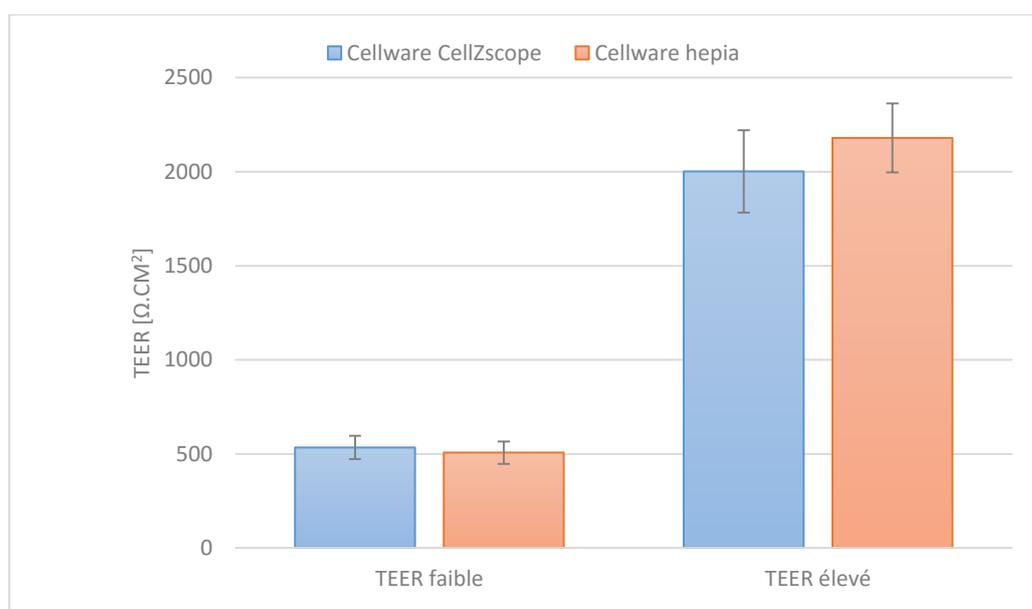


Figure 50 Test d'inversion des inserts entre le Cellware Hepia et le Cellware CellZscope à des phases différentes de formation de la barrière. Les moyennes sont effectuées sur 9 mesures (n=9). Les barres d'erreur sont les écart-types.

Les résultats obtenus indiquent que les valeurs mesurées dans chaque Cellware sont similaires et donc l'appareil n'est pas la raison d'une baisse de TEER. Que cela soit en début de formation des jonctions serrées ou au milieu de celle-ci les appareils mesurent la même chose.

3.5. Validation de Cellware Hepia avec fluide

L'intégration de la fluide sur le Cellware Hepia a été faite comme la figure 20 le présente. Dès lors un monitoring a été effectué sur des cellules MPKensemencées sous la membrane de l'insert pour imiter les conditions physiologiques avec le flux passant à côté d'elles comme présenté à la figure 51 ci-dessous.

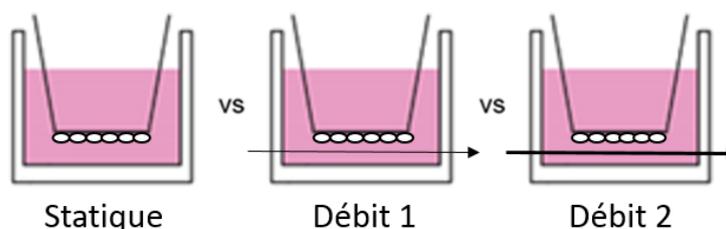


Figure 51 Schéma de l'expérience monitorée par le Cellware Hepia avec fluide comprenant 3 conditions : des cellules statiques ; des cellules sous un débit de milieu de 20 µl/min et des cellules sous un débit de milieu de 46 µl/min.

Trois conditions ont été testées soit une condition statique et deux conditions fluidiques avec deux débits différents : 20 µl/min et 46 µl/min. La figure 52 montre le résultat du monitoring.

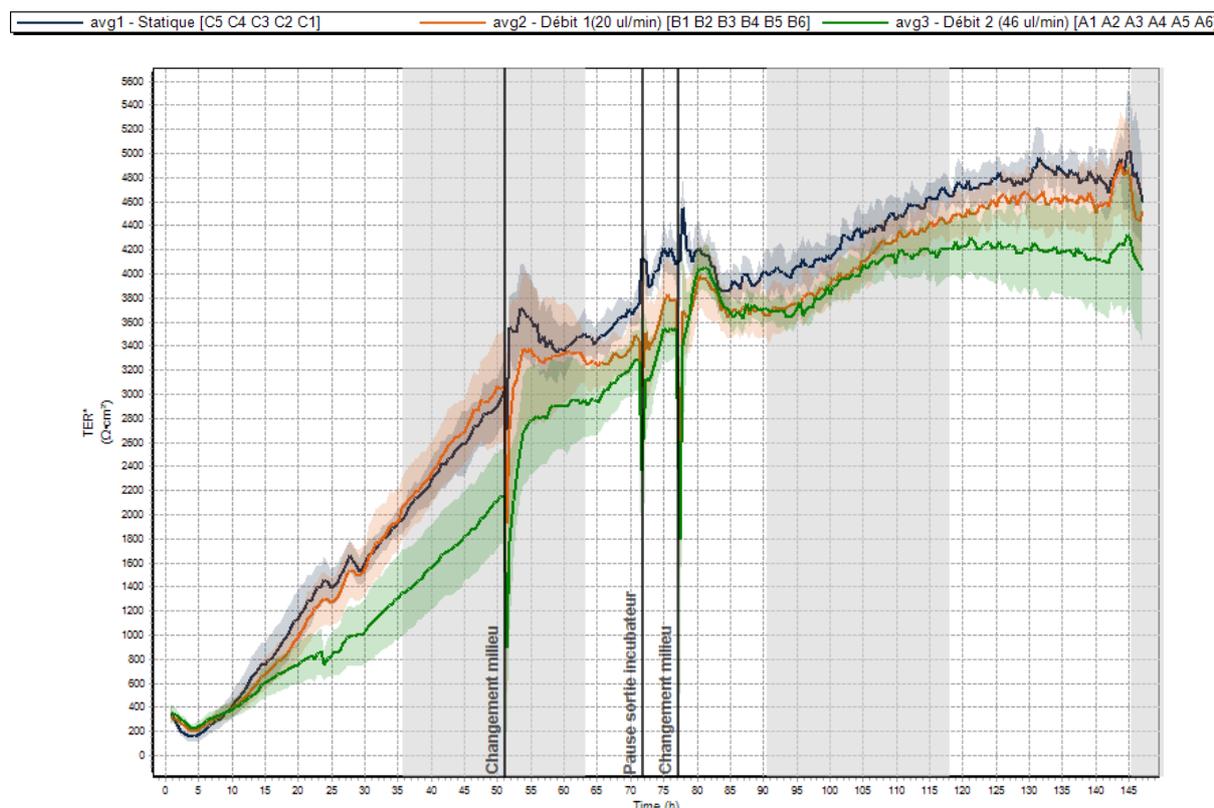


Figure 52 Monitoring du TEER sur une semaine (N=1) sur des cellules MPK en présence de fluide ; Ligne noire : moyenne des cellulesensemencées sous la membrane de l'insert et cultivées sous conditions statiques (n=4) ; Ligne orange : moyenne des cellulesensemencées sous la membrane de l'insert et cultivées sous conditions fluidique avec un débit de 20 µl/min (n=6) ; Ligne verte : moyenne des cellulesensemencées sous la membrane de l'insert et cultivées sous conditions fluidique avec un débit de 46 µl/min (n=6)

Les trois conditions sont très similaires. Une légère élévation de la valeur de TEER d'environ 500 Ohms*cm² est observée pour les cellules sous condition statique et les cellules en présence d'un débit de 20 µl/min par rapport aux cellules en présence d'un débit de 46 µl/min. Le plateau atteint pour les deux les deux conditions (sans fluide et avec débit 20 µl/min) une valeur de TEER oscillant entre 4'500 et 5'000 Ohms*cm². Alors que pour le débit de 46 µl/min, le plateau oscille entre 4'000 et 4'500 Ohms*cm².

Une validation nécessite toujours plusieurs fois la même expérience. De ce fait, un deuxième monitoring dans les mêmes conditions (volume, débit, Cellware Hepia) sur les cellules MPK a été effectué et le résultat est montré à la figure 53.

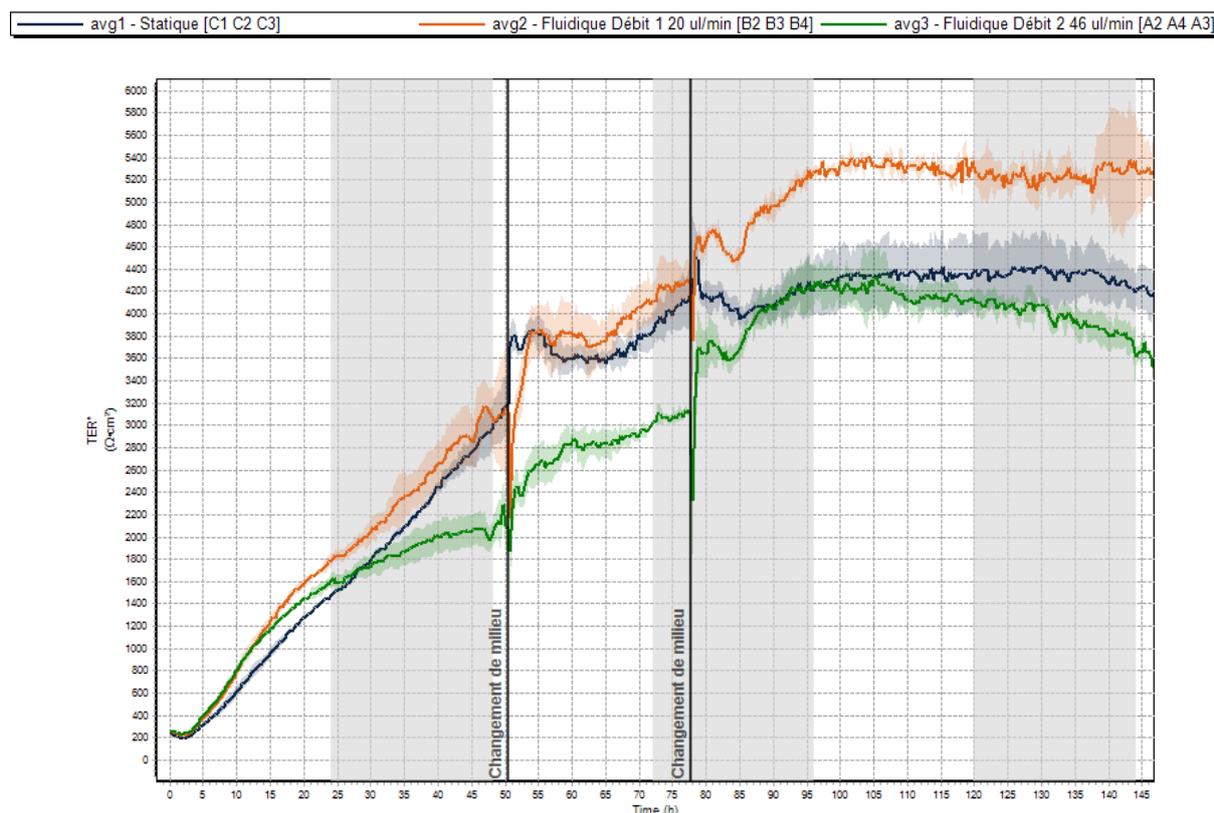


Figure 53 Monitoring du TEER sur une semaine (N=2) sur des cellules MPK en présence de fluide ; Ligne noire : moyenne des cellules ensemencées sous la membrane de l'insert et cultivées sous conditions statiques (n=3) ; Ligne orange : moyenne des cellules ensemencées sous la membrane de l'insert et cultivées sous conditions fluide avec un débit de 20 µl/min (n=3) ; Ligne verte : moyenne des cellules ensemencées sous la membrane de l'insert et cultivées sous conditions fluide avec un débit de 46 µl/min (n=3)

Les cellules atteignant les valeurs de TEER les plus élevées sont celles qui sont cultivées sous un flux de 20 µl/min. Les cellules ayant été en contact d'un flux de 46 µl/min sont tout au long de l'expérience à une valeur de TEER moins élevée d'environ 1'000 Ohms*cm². Tandis que les cellules cultivées sous condition statique ont leur valeur de TEER fluctuant entre les deux autres conditions. La figure 54 atteste de la viabilité des cellules par rapport à chaque condition.

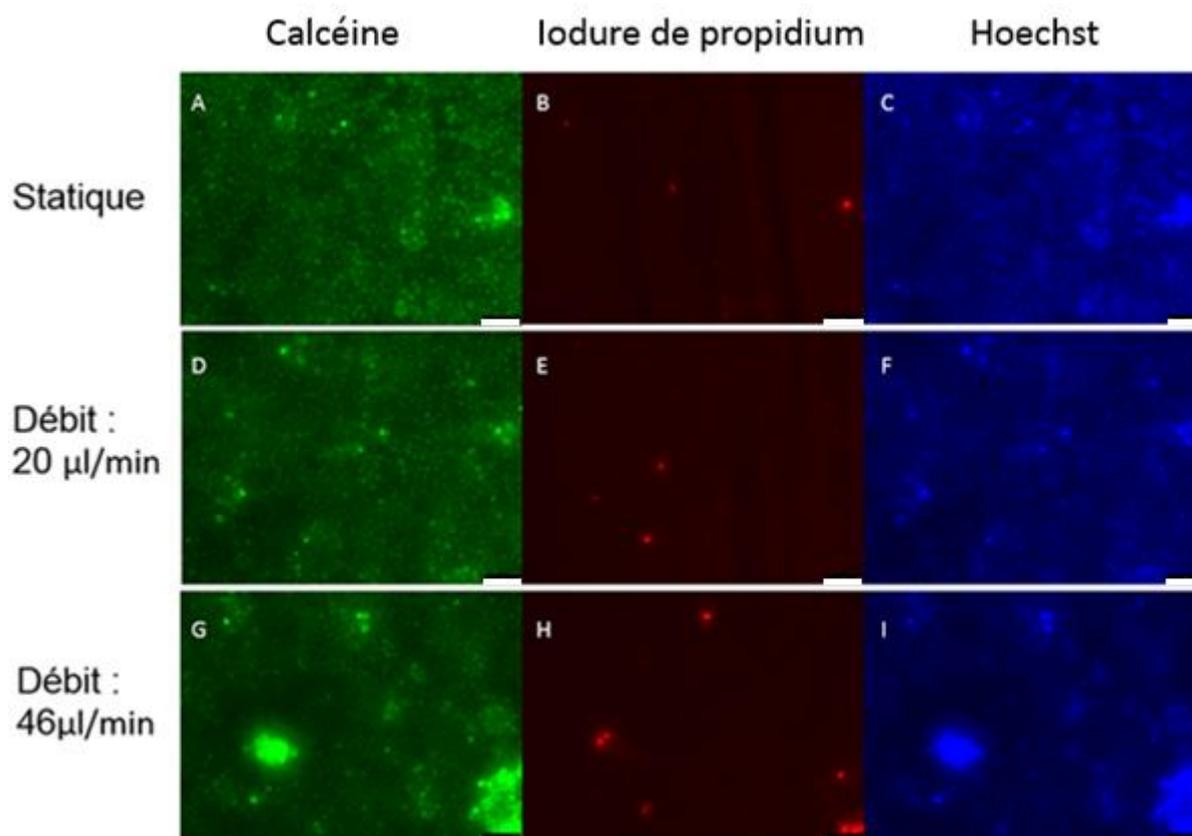


Figure 54 Test de viabilité sur les cellules cultivées avec le Cellware Hepia avec fluide : Condition statique (A) Calcéine ; (B) Iodure de propidium ; (C) colorant Hoechst ; Condition fluide débit 20 µl/min (D) Calcéine ; (E) Iodure de propidium ; (F) colorant Hoechst ; Condition fluide débit 46 µl/min (G) Calcéine ; (H) Iodure de propidium ; (I) colorant Hoechst ; Echelle 75 µm

La viabilité des cellules en condition statique et sous un débit de 20 µl/min sont similaires. Le colorant Hoechst est présent comme contrôle et permet de valider le résultat. Les cellules sous un débit de 46 µl/min ont un taux de mortalité légèrement plus élevé et il est remarqué sous calcéine que les cellules forment quelques amas.

3.6. Test de toxicité *in vitro*

Les tests de toxicité sont un exemple d'application des impédancemètres permettant le monitoring en continu. En effet, l'influence d'une molécule cible sur la croissance des cellules ou sur une barrière formée est très intéressante afin de déterminer la toxicité d'un composé. Les modèles *in vitro* permettent cette étude qui est trop difficile à faire *in vivo* et surtout dangereux. Le test consiste à monitorer la montée du TEER des cellules MPK jusqu'à que la barrière soit formée soit un TEER de 6'000 Ohms*cm². Puis l'ajout de mannitol à différentes concentrations s'est effectué dans le compartiment inférieur soit celui qui équivaut au compartiment sanguin. L'effet d'une exposition de 2 heures de mannitol à différentes concentrations sur les cellules MPK est montré à la figure 55.

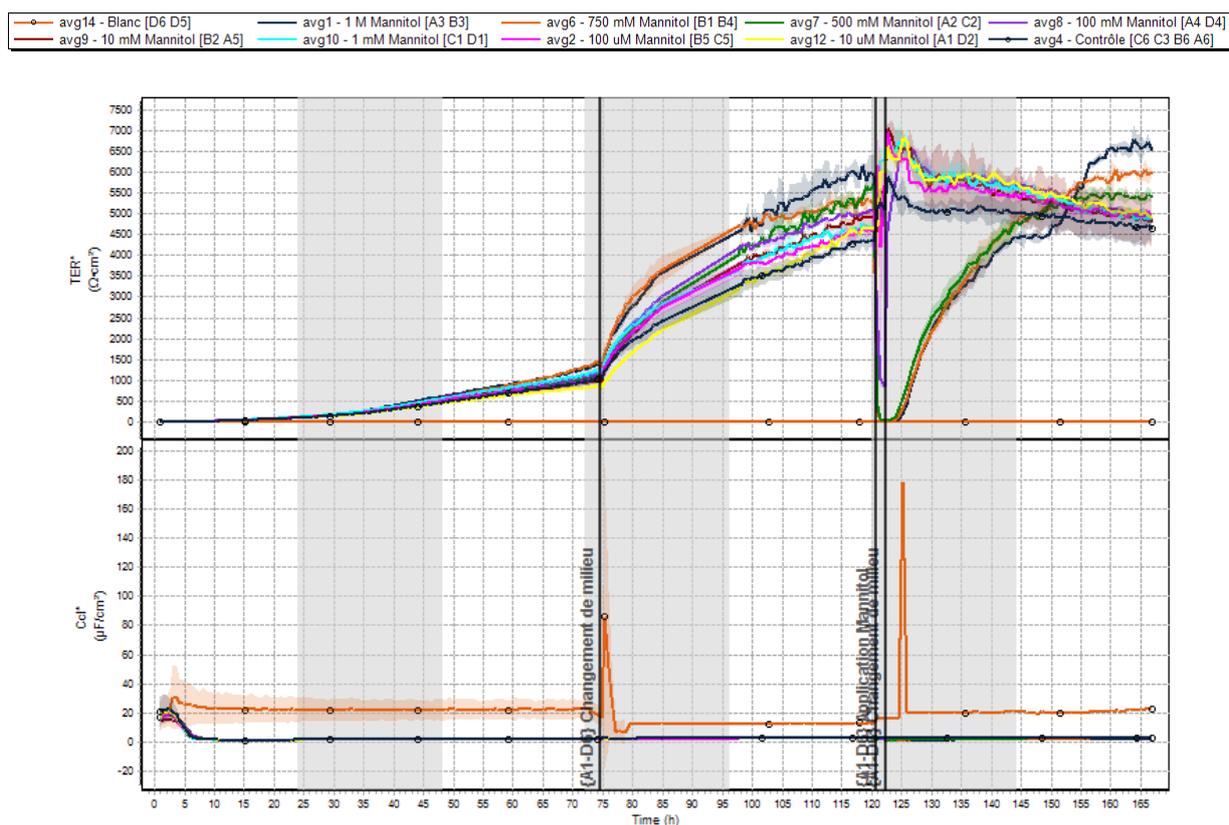


Figure 55 Test de toxicité : monitoring du TEER sur des cellules MPKensemencées à 178'600 cellules/cm² avec présence de mannitol pendant 2 heures ; ligne orange à rond : aucunes cellulesensemencées (blanc) ; ligne noire : exposition à une solution de mannitol 1 M ; ligne orange : exposition à une solution de mannitol 750 mM ; ligne verte : exposition à une solution de mannitol 500 mM ; ligne violette : exposition à une solution de mannitol 100 mM ; ligne brune : exposition à une solution de mannitol 10 mM ; ligne cyan : exposition à une solution de mannitol 1 mM ; ligne rose : exposition à une solution de mannitol 100 µM ; ligne jaune : exposition à une solution de mannitol 10 µM ; ligne noire à rond : aucune exposition à une solution de mannitol (Contrôle)

La montée du TEER se fait similairement pour la plupart des inserts. Quelques inserts contiennent des cellules qui croissent plus vite. Au temps 120 heures de culture, le mannitol est mis en présence des cellules. Il est remarqué que pour 3 concentrations (1 M, 750 mM et 500 mM), le TEER chute jusqu'à atteindre quasiment 0 Ohms*cm². Pour la concentration de 100 mM, le TEER descend jusqu'à 1'000 Ohms*cm². Tandis que pour les autres concentrations de mannitol, les changements de valeurs de TEER sont moindres voire nuls. Le contrôle permet de valider l'expérience. Les cellules ayant été exposées à des concentrations élevées en mannitol voit leur valeur de TEER augmentée et dépassée les valeurs des cellules ayant été exposées à de plus faibles concentrations.

Les valeurs de TEER de chaque concentration ont été normalisées afin d'obtenir des valeurs en pourcentage de TEER. La normalisation permet de structurer les résultats et permet de comparer les données avec d'autres manipulations. La figure 56 présente les données normalisées.

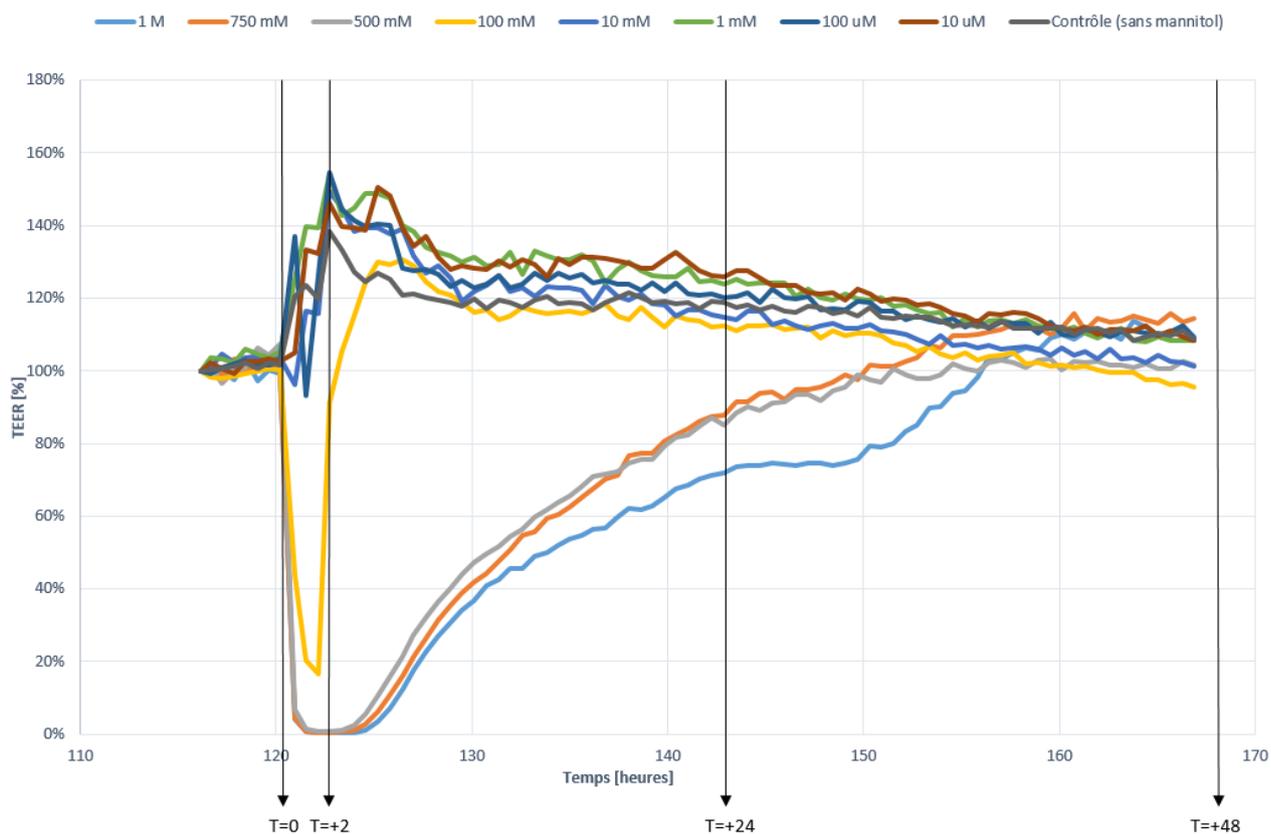


Figure 56 Graphe avec données normalisées sur le test de toxicité du mannitol; T=0 Début d'exposition du mannitol sur les cellules; T=+2 Fin d'exposition du mannitol sur les cellules; T=+24 24 heures après application du mannitol; T=+48 48 heures après application du mannitol

Les données normalisées suivent la même tendance que les données brutes. Il est constaté que pour les concentrations élevées (1 M, 750 mM et 500 mM), un jour et demi après le début de l'exposition au mannitol, les valeurs de TEER atteignent leur 100 % et le surpasse au bout de deux jours. Par contre pour les concentrations plus faibles (en-dessous de 100 mM), le TEER augmente directement après application du mannitol et décroît gentiment pour rester à des valeurs de 100 % après deux jours.

4. Discussion

4.1. Caractérisation des cellules MPK

La caractérisation des cellules MPK a été faite initialement sur la valeur du TEER que peut atteindre une barrière de cellules MPK. Les inserts permettent deux cas de figures pour l'ensemencement des cellules : soit sur la membrane, soit sous la membrane. Comme attendu, les deux ensemencements révèlent des comportements très similaires des valeurs de TEER sur un monitoring de neuf jours. Une tendance très légère à des valeurs plus élevées est observée pour les cellules sur la membrane. Le plateau est atteint après 5 jours de culture par cette barrière et atteint les 4'000 – 4'500 Ohms*cm². Cependant, d'autres essais doivent être effectués afin d'obtenir plus de précision et de diminuer l'écart-type pour les cellules ensemencées sous la membrane. L'écart-type est aussi grand dû à la faible reproductibilité qu'apportent les cellules et à la sensibilité de celles-ci. Une barrière de cellules MPK atteint des valeurs maximales en plateau de TEER de 5'500 Ohms*cm² après 5-6 jours de culture et un ensemencement de 60'000 cellules/insert lorsqu'il s'agit de la culture sur une surface de 0.33 cm². Une publication a montré obtenir un TEER d'environ 5'400 Ohms*cm² avec un ensemencement de 100'000 cellules/insert et une incubation de 14 jours [33]. La taille de la surface de culture a une influence sur la valeur de TEER. Effectivement, lorsqu'on cultive les cellules sur une surface de 1.12 cm², les valeurs de TEER atteignent des valeurs maximales en plateau de 7'000 Ohms*cm². Il n'est pas logique que les valeurs de TEER ne soit pas les mêmes, car celles-ci sont normalisées par rapport à la surface. Plus la taille de la barrière s'agrandit, plus la résistivité de celle-ci est élevée. Le marquage membranaire des jonctions serrées ZO-1 permet de parler d'une barrière vu le nombre de jonctions serrées ayant été marquées par fluorescence. Une barrière cellulaire, dans ce cas rénale, doit permettre une bonne étanchéité pour ne pas laisser passer de molécule indésirable dans le rein. Le test de perméabilité montre que les cellules ayant été ensemencées sur la membrane ont des coefficients de perméabilité plus petits. La barrière est donc plus étanche pour ce cas. Dans cette configuration, le Jaune lucifer est présent dans le compartiment urinaire. Dans la configuration contraire, les coefficients de perméabilité sont plus élevés. L'absorption du composé dans le tube collecteur se fait plus rapidement que la réabsorption du même composé dans le sang.

Le TEER apparait une fois les cellules à 100% de confluence. Le nombre de cellules ensemencées sur la membrane de l'insert joue un rôle sur la vitesse de formation des jonctions serrées. Un trop grand nombre de cellules initiales ne permettra pas à la barrière de se créer rapidement tout comme un nombre de cellules initiales trop faible. S'il y a trop de cellules des débris cellulaires ne permettront pas une couche cellulaire uniforme, tandis que s'il y en a trop peu les jonctions ne se forment pas. Une publication [34] a démontré que pour des cellules endothéliales microvasculaires de cerveau humain, un trop grand nombre de cellules ensemencées ne permet pas des hautes valeurs de TEER. Des cellules ensemencées à plus de 100'000 cellules /cm² n'est pas optimal dans ce cas de figure. L'intervalle optimal pour avoir une formation de la barrière rapide pour les cellules MPK est de 133'900 à 178'600 cellules /cm². Après 6 jours de culture les cellules ensemencées entre 89'300 et 312'500 cellules /cm² affiche sensiblement les mêmes valeurs de TEER.

Le sérum de foetus bovin contenu dans le milieu de culture est un élément nécessaire à la bonne croissance des cellules MPK. D'après les résultats, il semble que la présence de sérum permette une montée du TEER plus rapide. Néanmoins les cellules peuvent croître sans sérum. Les inserts utilisés ne sont pas les mêmes entre les deux premiers monitorages (monitorage 1 : polycarbonate et monitorage 2 : polyester) et cela peut expliquer la différence entre les tendances. Le troisième monitoring qui utilise les mêmes membranes que le deuxième suit la même tendance et montre un écart moins important entre les deux conditions que le premier monitoring utilisant les membranes en polycarbonate. Le sérum permet donc une montée de TEER plus rapide et la valeur de TEER en plateau après 6 jours de culture est de 7'000 Ohms*cm² tandis que sans sérum elle atteint 5'800 Ohms*cm².

Une étude [35] sur la différenciation avec du milieu sans sérum ou du milieu avec sérum sur des cellules intestinales Caco-2 montrent que les résultats se rapprochent du troisième monitoring. C'est-à-dire qu'après 15 et 21 jours de culture, ils obtiennent des valeurs de TEER plus élevées pour les milieux avec sérum. Le type cellulaire n'étant pas le même, il n'est pas possible de prétendre que les résultats sont similaires mais ceux-ci suivent une même tendance.

Les membranes des inserts en polyester par rapport aux membranes en polycarbonate permettent à la barrière d'être plus stable dans le temps. Les membranes sont disponibles avec la même porosité mais diffèrent en terme de densité de pores. Les membranes en PC ont plus de pores et diffèrent car visiblement elles sont opaques. La montée de TEER est similaire sur les deux membranes. Les cellules cultivées sur la membrane en polyester atteignent des valeurs de TEER d'environ 500 à 1'000 Ohms*cm² plus élevées que celles sur la membrane en polycarbonate. De plus, la barrière affiche une plus grande stabilité dans le maintien de ces jonctions serrées pour la membrane en PET. Le plateau est atteint après 5 jours de culture et a des valeurs de TEER de 6'600 Ohms*cm² (PET) et de 6'000 Ohms*cm² (PC). Une comparaison [36] de trois types de membranes différentes a montré que les membranes en polyester (PET) obtiennent les mêmes valeurs que les membranes en polytetrafluoroéthylène. Les deux membranes sont supérieures en matière de TEER aux membranes en ester de cellulose. Par contre les cellules ne forment pas tout à fait une monocouche sur le polytetrafluoroéthylène, ce qui crée des fluctuations du TEER. Les membranes en PET, comme dans le cas de ce projet sont les plus fiables et les plus utilisées. Elles permettent de par leur transparence de faire de l'imagerie directement sur l'insert.

4.2. Fluidique

La fluidique apportée par la chambre supérieure n'a pas fonctionné. Il s'agit d'un circuit fluidique en boucle fermée. Après 2 jours de culture sous flux, les cellules apparaissent arrondies caractéristique de mauvaise adhésion à la membrane. La culture statique en parallèle montre que les cellules ont adhéré à la membrane et ont une bonne croissance. Quand il n'y a aucun flux, les cellules prolifèrent normalement. Lorsqu'elles sont mises en présence d'un flux les cellules meurent. La diminution du débit de milieu de culture apportée par la fluidique pourrait régler le problème de la mauvaise adhésion des cellules. Une autre approche serait de changer la manière dont arrive le flux. Plutôt qu'il arrive verticalement sur les cellules, la voie horizontale serait privilégiée avec des débits faibles. Le flux vertical ne permettant peut être pas un flux laminaire, un flux turbulent décollerait les cellules de la membrane. La physiologie du corps humain veut que la partie basolatérale des cellules rénales soit en présence du flux sanguin. Pour des cellulesensemencées au-dessus de la membrane, le flux devrait venir donc de la chambre inférieure pour se rapprocher au mieux des conditions *in vivo*. Le Cellware Hepia avec fluidique permettra donc la fluidique venant par la chambre inférieure.

Sur une première version du Cellware Hepia sans impédance mais avec fluidique, la fluidique venant par la chambre inférieure ne fonctionne pas correctement dû à un problème de montage. Comme attendu les cellules ayant le flux depuis le compartiment sanguin, soit les cellules sur la membrane, ont des valeurs de TEER plus élevées que si la configuration est inversée. Les forces de cisaillements apportées par le flux permettent aux cellules de renforcer leur barrière. Dès le jour 6, une fuite est apparue et le constat voit les valeurs de TEER baissées pour les cellules avec et sans fluidique. Après le jour 6, les cellules avec fluidique perdent leur valeur de TEER, tandis que les cellules sans fluidique continuent à croître. Leur rangée de puits n'était pas atteinte par la fuite. La fuite est due à un mauvais collage des composants du Cellware Hepia. Il est très difficile de rendre le système étanche. Dans cette version uniquement le scotch double face a été utilisé. Pour les prochaines versions, le tour des puits sera collé en plus d'être plaqué avec le scotch. Maintenant, il est essayé de tout monter avec de la colle et ne plus avoir de scotch. Les écart-types sont très marqués pour certaines mesures. Cela réside dans divers problèmes. Premièrement l'appareil de mesure donne des grandes fluctuations sur la

même mesure du fait que la distance entre les électrodes peut changer durant la mesure. Si l'électrode est mal immergée la mesure est complètement faussée. Deuxièmement, les cellules sont stressées. Pour faire les mesures, il est obligatoire de sortir la plaque de l'incubateur, se mettre sous le flux laminaire, ouvrir la plaque et faire les mesures. Les cellules souffrent et les valeurs de TEER peuvent vite fluctuer à cause de ce stress. De plus, entre chaque mesure, les électrodes sont rincées à l'eau, puis à l'éthanol et encore une fois à l'eau. Un petit reste d'éthanol sur une électrode peut apporter une grande fluctuation car il est toxique pour les cellules.

De manière générale, les débits autorisés par les pompes utilisés sont trop élevé par rapport à la situation *in vivo*. Bakmand et al. ont développé un système de fluide pour le monitoring et la culture de coupes de cerveaux organotypiques [37] et le débit utilisé était de 0.6 $\mu\text{l}/\text{min}$. Les cellules n'ont pas eu de problèmes de croissance à un débit aussi faible. Nayalanda et al. ont fait des mesures sur une barrière épithéliale pulmonaire afin d'étudier les lésions provoquées par la ventilation grâce à un système fluide permettant des débits de 1 $\mu\text{l}/\text{min}$ [38]. Les débits autorisés par les pompes utilisés sont trop élevé par rapport à la situation *in vivo*. Des nouveaux types de pompes ou des moteurs avec des puissances moindres sont prévus en vue de diminuer les débits.

4.3. Validation du Cellware Hepia

L'appareil de référence utilisé durant ce projet est l'impédancemètre nommé CellZscope [39]. Pour valider un nouvel impédancemètre, celui-ci doit obtenir des résultats au minimum équivalents à un appareil déjà sur le marché voire meilleurs. Le monitoring de la formation d'une barrière rénale avec les cellules MPK a fonctionné avec le Cellware Hepia comme attendu. Les tendances sont similaires mais les valeurs absolues peuvent différer jusqu'à 1'000 $\text{Ohms}\cdot\text{cm}^2$ entre les deux appareils. Cette différence peut venir du Cellware Hepia. S'agissant d'un appareil conçu par les ingénieurs du laboratoire, le Cellware Hepia est fabriqué avec des composants ayant la capacité d'optimiser un coût relativement bas de l'appareil et étant des matériaux plutôt basiques. Mais la différence peut aussi venir de la variabilité biologique des cellules. La piste du Cellware est privilégiée. Les composants de celui-ci sont biocompatibles car les cellules n'ont aucun problème de croissance en présence de ceux-ci. Les plots en inox résistent très bien à l'humidité et ne présentent aucun signe de corrosion tandis que les connecteurs plaqués or, eux, sont oxydés et donc ne résistent pas très bien à l'humidité. Sachant que la corrosion est très mauvaise pour le développement des cellules [40], cela pourrait devenir un problème pour des monitorages à très longs termes. Une étude de biocompatibilité sur l'acier inoxydable doit être faite. Les électrodes sont en acier inoxydable et ne devraient présenter aucun danger pour les cellules, mais il existe différents types d'inox suivant le domaine dans lequel on travaille. Les biocompatibilités [41] sont différentes et dès que l'on travaille avec des cellules de l'acier inoxydable médical devrait être utilisé. Une validation doit pouvoir être reproductible, c'est-à-dire qu'à chaque mesure différente les résultats suivent la même tendance. Une certaine variabilité biologique doit cependant être autorisée. Cependant, le TEER monte plus lentement dans le Cellware Hepia. Le plateau est atteint après 6 jours de culture pour le CellZscope et 7 jours de culture pour le Cellware Hepia. Mais cela ne pose pas de problème, car pour comparer des valeurs les données sont normalisées et les valeurs sont en pourcentage de TEER. La valeur absolue d'une mesure de TEER devient dans ce cas moins importante. Cette différence entre les deux appareils pourrait venir de la distance entre les électrodes ou de la surface des électrodes.

Dans le Cellware Hepia, une variation de la surface de l'électrode inférieure a un effet négligeable sur le TEER. Par contre le CellZscope qui a une électrode plus petite a un TEER plus élevé. La cause de cette différence est donc à chercher ailleurs et pourrait être la distance entre les électrodes. La conception d'un Cellware avec des puits transparents seraient permises de faire de l'imagerie directement dans cet appareil.

Les conformations d'appareil ont une influence sur la mesure du TEER. Le CellZscope et le Cellware Hepia ont une distance entre les deux électrodes similaires. Par contre les distances à la membrane diffèrent. Pour un TEER faible, cette différence peut être observée mais quand le TEER est élevé, cette différence est négligeable. Il semblerait qu'une distance trop faible entre l'électrode supérieure et les cellules détruit la barrière. La conformation des distances entre les électrodes pourrait expliquer cette différence.

La température a une influence sur la mesure du TEER sans cellules. La température optimale pour la culture cellulaire est de 37°C. Une variation de température peut vite induire une déstabilisation, un stress sur les cellules [42]. Un stress varie fortement les valeurs de TEER mesurées. La température du liquide à l'intérieur de chaque appareil est très importante. C'est à 37°C que l'influence de la température sur la mesure du TEER est la plus faible. L'inertie est très différente entre les deux appareils. Le CellZscope a une inertie beaucoup plus grande, c'est-à-dire qu'il mettra beaucoup plus de temps à se chauffer ou se refroidir que le Cellware Hepia. Le Cellware Hepia est plus sensible aux changements de température. Cette différence d'inertie est due à la conception de chaque appareil. Le CellZscope est imposant, lourd et fait de partie métallique. Le Cellware Hepia, lui est léger, assez petit et composé en grande partie de matériau non-métallique. Lorsqu'on manipule l'un ou l'autre appareil hors de l'incubateur en présence de cellules, les manipulations doivent être rapides. Il faut minimiser les changements de température. Il faut toujours préchauffer l'appareil avant d'y mettre des cellules en culture. C'est pourquoi l'intégration de la fluidique pour changer le milieu de culture ou ajouter une molécule peut s'avérer très utile car l'appareil resterait dans l'incubateur à la bonne température. Avec les cellules, la même expérience est très compliquée. A 4°C, les cellules sont stressées et le TEER aura une valeur faible non pas par la mesure mais pas la biologie.

4.4. Validation de Cellware Hepia avec fluidique

D'un point de vue technique, le Cellware Hepia avec fluidique a permis de monitorer des cellules MPK en présence d'un flux sur le long terme.

D'un point de vue biologique, le flux fait varier la valeur de TEER des cellules. Les forces de cisaillement qui sont créées par le flux sanguin permettent le renforcement de la barrière [43]. Le débit est un paramètre très important qui peut avoir des effets contraires suivant la puissance de celui-ci. Il peut de plus permettre une sélectivité différente de certaines protéines, soit un transport favorisé ou défavorisé [44]. Le Cellware Hepia avec fluidique est donc testé avec deux débits différents, soit 20 µl/min et 46 µl/min. La littérature ne définit pas de débits précis pour chaque type cellulaire. Plusieurs débits sont utilisés selon les organes mais il s'agit d'expériences [45-46]. Des résultats différents ne permettent pas de prouver qu'un flux de 20 µl/min permet des valeurs de TEER plus élevées qu'une culture sans fluidique. Ces différences peuvent être soit grâce au flux soit à cause de la variabilité biologique. Un débit de 46 µl/min empêche les cellules de croître correctement. Des valeurs de TEER moins élevées de 500 Ohms*cm² sont mesurées. Le plateau est atteint après 4 jours de culture pour chaque condition. D'autres mesures doivent être effectuées pour obtenir une certaine reproductibilité, une tendance malgré la variabilité biologique.

Avec un débit de 46 µl/min, les cellules ont tendance à former des petits amas ce qui peut expliquer une barrière moins robuste. Le flux crée trop de forces de cisaillement et celles-ci font souffrir les cellules qui s'amassent en boule. Un débit de 20 µl/min n'a aucune influence négative en termes de viabilité.

Finalement, il suffit de trouver le flux optimal pour un type de cellules car la mesure du TEER en elle-même n'est pas influencée par la fluidique.

4.5. Test de toxicité *in vitro*

Le mannitol est toxique pour les cellules à des concentrations de 1 M, 750 mM et 500 mM. Les tests de toxicité déterminent si un composé est inoffensif, toxique ou létal pour un certain type de cellules et le TEER permet de juger de l'état de santé des cellules [47]. Le mannitol est utilisé pour traiter des cas d'insuffisance rénale oligurique. Cependant Dorman et al. [48] ont démontré que le mannitol pouvait induire des insuffisances rénales aiguës chez les patients. Les mesures de contrôle étaient le taux de créatinine dans le sérum et l'osmolarité dans le sérum. En comparant aux résultats obtenus dans le cas de ce projet, les trois concentrations les plus élevées (1 M, 750 mM et 500 mM) créent une ouverture de la barrière et donc les jonctions serrées se cassent et la valeur de TEER chute. Cette ouverture transitoire de la barrière montre que le composé est toxique mais n'est pas létal car les jonctions serrées peuvent se reformer. Une concentration de 100 mM résulte en une ouverture partielle de la barrière mais celle-ci se reforme. Cela confirme les études pharmacologiques qui utilisent le mannitol pour faire pénétrer des médicaments (qui normalement ne passe pas) à travers les barrières. Cette concentration permet une ouverture de très courte durée de la barrière car 5 heures après l'application du mannitol la barrière est reformée. Les concentrations de mannitol en-dessous de 100 mM n'ont aucun effet négatif sur les cellules. Au contraire, une fois en présence du mannitol la barrière contient plus de jonctions serrées. Les valeurs de TEER augmentent jusqu'à la fin de l'exposition au mannitol puis diminuent gentiment pour atteindre le 100 % initial. L'étape suivante serait d'incorporer la fluidique aux tests de toxicité et voir l'influence qu'à celles-ci sur le TEER.

5. Conclusion et perspectives

En conclusion, Le Cellware Hepia sans fluide est validé biologiquement, car il permet de cultiver des cellules en mesurant l'impédance en continue. L'intégration de la fluide dans la chambre inférieure a fonctionné et a permis de mettre les cellules en présence d'un flux et d'en mesurer l'impédance sur un long terme. Cependant, la montée du TEER dans les deux appareils n'est pas identique dans le temps et en valeurs maximales. Cela n'est pas un problème pour les biologistes car les résultats sont souvent exprimés en pourcentage de TEER (données normalisées) pour éliminer cette fluctuation biologique entre les échantillons.

Pour le Cellware Hepia avec fluide, la fluide dans la chambre inférieure a fonctionné et le monitoring a pu être fait. Mais la biologie des cellules dans le flux doit être optimisée. Cela implique une modification des pompes utilisées pour avoir des débits plus faibles. Le montage du Cellware Hepia est à optimiser. Aucune fuite ne devrait apparaître par la suite. La conformation de la distance électrode-membrane de l'insert est à étudier plus profondément et à optimiser pour obtenir des valeurs plus stables et meilleures que le CellZscope.

Une fois que le Cellware aura pu être totalement validé, la partie électronique (Hardware Hepia) (Annexe 8.11) devra aussi être validée en faisant des mesures avec le Cellware Hepia et le Cellware CellZscope, mais cette fois-ci l'électronique développée par les ingénieurs du laboratoire. Des comparaisons entre les deux électroniques sur le même Cellware devront aussi être effectuées et l'appareil complet devra obtenir pour un monitoring sur les mêmes cellules des valeurs de TEER égales ou meilleures que celles obtenues par le CellZscope.

La mesure de la bioimpédance de barrière en continue permet de réaliser des études *in vitro* sur la toxicologie de composés. Dans le cas du mannitol, il serait intéressant de voir si celui-ci permet une augmentation du TEER à des concentrations plus faibles que 100 mM en laissant les cellules en présence du mannitol plus que 2 heures. Des études de toxicologie en présence d'un flux permettront donc de se rapprocher encore plus de la situation *in vivo* et l'évolution de la pharmacocinétique des médicaments.

La validation a été faite sur des cellules MPK car elles sont biologiquement plus faciles à cultiver et présentent un TEER élevé. Maintenant il faut confirmer avec un autre modèle cellulaire comme la BHE, qui a un intérêt plus grand pour les biologistes mais qui est plus complexe à cultiver et à avoir un TEER correct. Les mesures et monitorages de TEER sur d'autres barrières comme la barrière hémato-encéphalique, l'une des plus importantes du corps humain fait aussi partie de la suite des expériences. La fluide sur cette barrière est très importante pour voir la réaction de celle-ci en matière de TEER. La BHE doit être très sélective quant à ce qu'elle laisse passer dans le cerveau. Un modèle *in vitro* de barrière hémato-encéphalique ayant un TEER élevé serait une avancée pour la technologie.

6. Remerciement

J'adresse mes remerciements aux personnes qui m'ont aidé dans la réalisation de ce travail de diplôme.

En premier lieu, je remercie M. Zinn, professeur à la HES-SO Valais/Wallis. En tant que superviseur de projet, il m'a donné des conseils pour mon travail écrit.

Je remercie le Prof. Luc Stoppini, professeur à l'HEPIA HES-SO Genève, m'ayant accueilli et supervisé durant mon travail de diplôme.

Je remercie aussi M. Roux, assistant de recherche à l'HEPIA HES-SO Genève, qui m'a aidé en me fournissant de multiples informations sur le sujet étudié et m'expliquant toute la pratique derrière celui-ci.

Je remercie M. Fischler, étudiant en master à l'HEPIA HES-SO Genève, m'ayant expliqué toute la théorie basée derrière le sujet du projet et m'ayant procuré tous les outils nécessaire pour mon projet.

Je remercie M^{me} Nikles, laborantine à l'HEPIA HES-SO Genève, m'ayant aidé et conseillé durant mes manipulations.

Je remercie M. Eggermann, assistant de recherche à l'HEPIA HES-SO Genève, m'ayant conseillé pour certaines expériences.

Je remercie finalement M^{me} Zurbruggen, ancienne assistante à la HES-SO Valais/Wallis pour m'avoir guidé dans mon travail et m'avoir aidé à trouver des solutions pour avancer.

7. Bibliographie

- [1] Modifiée de http://fr.123rf.com/images-libres-de-droits/corps_humain_anatomie.html?mediapopup=30793854, visité le 15.06.2016
- [2] Extraite de <http://www.corpshumain.ca/Cerveau3.php>, visité le 22.07.2016
- [3] Weksler, B. B., et al. (2005). "Blood-brain barrier-specific properties of a human adult brain endothelial cell line." *Faseb j* 19(13): 1872-1874.
- [4] Sano, Y., et al. (2010). "Establishment of a new conditionally immortalized human brain microvascular endothelial cell line retaining an *in vivo* blood-brain barrier function." *J Cell Physiol* 225(2): 519-528.
- [5] Da, S. F. L., et al. (2014). Modèle de barrière hémato-encéphalique humaine dérivé de cellules souches, Google Patents.
- [6] Extraite de http://www.dematice.org/ressources/PCEM2/Histologie/P2_histo_001/pres/co/Module_urinaire_6.html, visité le 15.06.2016
- [7] Barlovatz-Meimon G., Ronot X., Culture de cellules animales, 3^{ème} édition, Lavoisier TEC&DOC, 454-455
- [8] Modifiée de <http://www.cuen.fr/lmd/spip.php?rubrique12>, visité le 04.08.2016
- [9] MacKay, K. et al. Glomerular epithelial, mesangial, and endothelial cell lines from transgenic mice. *Kidney Int.* 33, 677-684
- [10] Modifiée de Benson et al. *Fluids and Barriers of the CNS* 2013, 10:5
- [11] Chaturvedi PR, Decker CJ, Odinecs A. Prediction of pharmacokinetic properties using experimental approaches during early drug discovery. *Curr Opin Chem Biol.* 2001;5(4):452–463.
- [12] J.H. Yeon, J.K. Park, Microfluidic cell culture systems for cellular analysis, *Biochip J.*, 1 (2007), pp. 17–27
- [13] C. Yi, C.W. Li, S. Ji, M. Yang, Microfluidics technology for manipulation and analysis of biological cells, *Anal. Chim. Acta.*, 560 (2006), pp. 1–23
- [14] S.K. Yoo, J.H. Lee, S.S. Yun, M.B. Gu, J.H. Lee, Fabrication of a bio-MEMS based cell-chip for toxicity monitoring, *Biosens. Bioelectron.*, 22 (2007), pp. 1586–1592
- [15] G.M. Walker, H.C. Zeringue, D.J. Beebe, Microenvironment design considerations for cellular scale studies, *Lab Chip*, 4 (2004), pp. 91–97
- [16] I. Meyvantsson, D.J. Beebe, Cell culture models in microfluidic systems, *Ann. Rev. Anal. Chem.*, 1 (2008), pp. 423–449
- [17] Cucullo, L., et al. (2011). "The role of shear stress in Blood-Brain Barrier endothelial physiology." *BMC Neurosci* 12: 40.
- [18] Ouattara DA, Choi SH, Sakai Y, Péry AR, Brochot C., Kinetic modelling of *in vitro* cell-based assays to characterize non-specific bindings and ADME processes in a static and a perfused fluidic system, *Toxicol Lett.* 2011 Sep 10;205(3):310-9. doi: 10.1016/j.toxlet.2011.06.021. Epub 2011 Jun 23.

- [19] P. Chao, T. Maguire, E. Novik, K.-C. Cheng, and M.L. Yarmush, Evaluation of a microfluidic based cell culture platform with primary human hepatocytes for the prediction of hepatic clearance in human, *Biochem Pharmacol.* 2009 Sep 15; 78(6): 625–632.
- [20] Shah P, Fritz JV, Glaab E, Desai MS, Greenhalgh K, Frachet A, Niegowska M, Estes M, Jäger C, Seguin-Devaux C, Zenhausern F, Wilmes P, A microfluidics-based in vitro model of the gastrointestinal human-microbe interface, *Nat Commun.* 2016 May 11;7:11535. doi: 10.1038/ncomms11535.
- [21] Andrew D. Wong, Mao Ye, Amanda F. Levy, Jeffrey D. Rothstein, Dwight E. Bergles and Peter C. Searson, The blood-brain barrier: an engineering perspective, *Front Neuroeng.* 2013; 6: 7.
- [22] Booth R, Kim H, Characterization of a microfluidic in vitro model of the blood-brain barrier (μ BBB), *Lab Chip.* 2012 Apr 24;12(10):1784-92. doi: 10.1039/c2lc40094d. Epub 2012 Mar 15.
- [23] Balabhaskar Prabhakarandian, Ming-Che Shen, Joseph B. Nichols, Ivy R. Mills, Marta Sidoryk-Wegrzynowicz, Michael Aschner, and Kapil Pant, SyM-BBB: A Microfluidic Blood Brain Barrier Model, *Lab Chip.* 2013 Mar 21; 13(6): 1093–1101.
- [24] Hatherell K, Couraud PO, Romero IA, Weksler B, Pilkington GJ, Development of a three-dimensional, all-human in vitro model of the blood-brain barrier using mono-, co-, and tri-cultivation Transwell models., *J Neurosci Methods.* 2011 Aug 15;199(2):223-9. doi: 10.1016/j.jneumeth.2011.05.012. Epub 2011 May 14.
- [25] Ethan S. Lippmann, Abraham Al-Ahmad, Samira M. Azarin, Sean P. Palecek and Eric V. Shusta, A retinoic acid-enhanced, multicellular human blood-brain barrier model derived from stem cell sources, *Sci Rep.* 2014; 4: 4160.
- [26] Mizee MR, Wooldrik D, Lakeman KA, van het Hof B, Drexhage JA, Geerts D, Bugiani M, Aronica E, Mebius RE, Prat A, de Vries HE, Reijkerkerk A, Retinoic acid induces blood-brain barrier development., *J Neurosci.* 2013 Jan 23;33(4):1660-71. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1338-12.2013.
- [27] Nicholas Ferrell, Ravi R. Desai, Aaron J. Fleischman, Shuvo Roy, H. David Humes, and William H. Fissell, A Microfluidic Bioreactor With Integrated Transepithelial Electrical Resistance (TEER) Measurement Electrodes for Evaluation of Renal Epithelial Cells, *Biotechnol Bioeng.* 2010 Nov 1; 107(4): 707–716.
- [28] L. Choucha-Snouber, L.Griscom, PE. Poleni, F.Razan, C. Brochot, C. Aninat, A. Corlu, C. Legallais, E. Leclerc, LIVER-KIDNEY MICROFLUIDIC BIOREACTOR FOR CELL COCULTURE IN DRUG STUDIES, Université de Technologie de Compiègne
- [29] Sciancalepore AG, Sallustio F, Girardo S, Passione LG, Camposeo A, et al. (2015) Correction: A Bioartificial Renal Tubule Device Embedding Human Renal Stem/Progenitor Cells. *PLoS ONE* 10(5): e0128261. doi: 10.1371/journal.pone.0128261
- [30] Sung JH, Shuler ML (2009) Prevention of air bubble formation in a microfluidic perfusion cell culture system using a microscale bubble trap. *Biomed Microdevices* 11: 731–738. doi: 10.1007/s10544-009-9286-8
- [31] <https://fr.wikipedia.org/wiki/Mannitol>, visité le 15.08.2016
- [32] Allen R. Nissenson, Raymond E. Weston and Charles R. Kleeman, Mannitol, *West J Med.* 1979 Oct; 131(4): 277–284.

- [33] Chen X, Zhu H, Liu X, Lu H, Li Y, Wang J, Liu H, Zhang J, Ma Q, Zhang Y, Characterization of Two Mammalian Cortical Duct Cell Lines with Hopping Probe Ion Conductance Microscopy, *J Membr Biol.* 2013 Jan;246(1):7-11. doi: 10.1007/s00232-012-9495-6. Epub 2012 Sep 9.
- [34] Hannah K Wilson, Scott G Canfield, Michael K Hjortness, Sean P Palecek, and Eric V Shusta, Exploring the effects of cell density on the differentiation of human pluripotent stem cells to brain microvascular endothelial cells, *Fluids Barriers CNS.* 2015; 12: 13.
- [35] Ferruzza S, Rossi C, Sambuy Y, and Scarino M-L, Serum-Reduced and Serum-Free Media for Differentiation of Caco-2 Cells, *ALTEX.* 2013;30(2):159-68.
- [36] Z Tahir M, George F, and Donnay I, Comparison of different membrane supports for monolayer culture of bovine oviduct epithelial cells, *BMC Proc.* 2011; 5(Suppl 8): P117.
- [37] Bakmand T, Troels-Smith AR, Dimaki M, Nissen JD, Andersen KB, Sasso L, Waagepetersen HS, Gramsbergen JB, Svendsen WE, Fluidic system for long-term in vitro culturing and monitoring of organotypic brain slices., *Biomed Microdevices.* 2015 Aug;17(4):71. doi: 10.1007/s10544-015-9973-6.
- [38] Nalayanda DD, Fulton WB, Wang TH, Abdullah F, A multphase fluidic platform for studying ventilator-induced injury of the pulmonary epithelial barrier. *Integr Biol (Camb).* 2013 Sep;5(9):1141-8. doi: 10.1039/c3ib40037a.
- [39] <http://www.nanoanalytics.com/en/hardwareproducts/cellzscope/index.php>, visité le 15.07.2016
- [40] Daniel Krewski, Robert A Yokel, Evert Nieboer, David Borchelt, Joshua Cohen, Jean Harry, Sam Kacew, Joan Lindsay, Amal M Mahfouz, and Virginie Rondeau, HUMAN HEALTH RISK ASSESSMENT FOR ALUMINIUM, ALUMINIUM OXIDE, AND ALUMINIUM HYDROXIDE, *J Toxicol Environ Health B Crit Rev.* 2007; 10(Suppl 1): 1–269. doi:10.1080/10937400701597766
- [41] L. HJIYEJ ANDALOUSSI, N. HABTI, T. ABOUSSAOUIRA, J. MITALANE, F. EL MDARI, S. EL ADIOUI-JOUNDY., Etude de la cytotoxicité de l'acier inoxydable AISI 316L sur culture de myélomes de souris, *Biologie & Santé* vol. 6, n° 1, 2006
- [42] Watanabe I, Okada S., Effects of temperature on growth rate of cultured mammalian cells (L5178Y)., *J Cell Biol.* 1967 Feb;32(2):309-23.
- [43] Cucullo L, Hossain M, Puvenna V, Marchi N, Janigro D., The role of shear stress in Blood-Brain Barrier endothelial physiology., *BMC Neurosci.* 2011 May 11;12:40. doi: 10.1186/1471-2202-12-40.
- [44] John M. Tarbell, Shear stress and the endothelial transport barrier, *Cardiovasc Res.* 2010 Jul 15; 87(2): 320–330.
- [45] Mandy B. Esch, Jean-Matthieu Prot, Ying I. Wang, Paula Miller, Jose Ricardo Llamas-Vidales, Brian A. Naughton, Dawn R. Applegate, and Michael L. Shuler, Multi-Cellular 3D Primary Liver Cell Cultures Elevate Metabolic Activity Under Fluidic Flow, *Lab Chip.* 2015 May 21; 15(10): 2269–2277. doi: 10.1039/c5lc00237k
- [46] Essig M, Friedlander G., Tubular shear stress and phenotype of renal proximal tubular cells., *J Am Soc Nephrol.* 2003 Jun;14 Suppl 1:S33-5.
- [47] Srinivasan B, Kolli AR, Esch MB, Abaci HE, Shuler ML, Hickman JJ, TEER measurement techniques for in vitro barrier model systems., *J Lab Autom.* 2015 Apr;20(2):107-26. doi: 10.1177/2211068214561025. Epub 2015 Jan 13.

- [48] Dorman HR, Sondheimer JH, Cadnapaphornchai P, Mannitol-induced acute renal failure., *Medicine (Baltimore)*. 1990 May;69(3):153-9.

8. Annexes

8.1. Matériel et protocole du comptage de cellules

- Luna Automated Cell Counter
 - Luna Cell Counting Slides (Logos biosystems, ref# L12001)
 - Trypan Blue Stain (0.4%) (Gibco, ref# 15250-061).
- o Prendre 10 μ l de suspension de cellules à compter
 - o Ajouter le même volume de Trypan Blue Stain,
 - o Transférer 10 μ l du mélange dans la chambre de comptage
 - o Insérer la chambre de comptage dans le Luna Automated Cell Counter.
 - o Appuyer sur le bouton "Count"

8.2. Lignée cellulaire Cellule MPK

Milieu de culture

Composition du milieu :

DMEM-F12 avec Rouge de phénol-GlutaMAX (Gibco, # 31331) gardé à 4°C.

Insuline (Sigma, # I-1882) stock à 10 mg/ml

→ Dissoudre 100 mg dans 9.9 ml SFW + 0.1 ml acide acétique, gardé à 4°C

Dexamethasone (Sigma, # D-8893) stock à 6.25 mM

→ Dissoudre 1 mg dans 2.5 ml Ethanol 95 %, gardé à 4°C.

Selenium (Sigma # S-9133) stock à 6 mM

→ Dissoudre 1 mg dans 10 ml SFW, gardé à 4°C.

Transferrine (Sigma, # T-1428) stock à 5 mg/ml

→ Dissoudre 100 mg dans 20 ml SFW, aliquoter 500 μ l/tube and gardé à -20°C.

Triiodothyronine (Sigma, # T-5516) stock à 100 μ M

→ Dissoudre 1 mg dans 14.925 ml Ethanol 95 %, gardé à 4°C.

Mouse Endothelial Growth Factor (Sigma, # E-4127) stock à 10 μ g/ml

→ Dissoudre 100 μ g dans 1 ml SFW, gardé à -20°C.

Pénicilline / Streptomycine

Sérum fœtal de veau décomplémenté gardé à -20°C.

Préparation du milieu

Tableau 3 Compositions du milieu de culture pour les cellules MPK

Product	MPK+MCCD	Concentration initiale (stock)	Concentration finale	Milieu sans sérum
DMEM-F12	500 ml			500ml
Insuline	250 μ l	10 mg/ml	5 μ g/ml	
Dexamethasone	4 μ l	6.25 mM	50 nM	
Sélénium	5 μ l	6 mM	60 nM	5 μ l

Transferrine	500 µl	5 mg/ml	5 µg/ml	500 µl
Triiodothyronine	5 µl	100 µM	1nM	
Mouse EGF	250 µl	10 µg/ml	5 ng/ml	
Pénicilline / Streptomycine	5 ml		100 U	
Sérum fœtal de veau décomplémenté	10 ml	100%	2%	

Décongélation des cellules

- Allumer le bain marie à 37°C
- Sortir l'ampoule de cellules de 1ml de l'azote
- La tremper dans le bain marie jusqu'à ce qu'il reste un petit glaçon
- Aspirer et refouler avec une pipette P1000 pour faire fondre le glaçon et homogénéiser les cellules
- Repartir les 1 ml dans le récipient de culture
- Ajouter le volume adéquat de milieu MPK selon le flasque
- Mélanger le récipient en formant des 8
- Incuber à 37°C 5% CO₂

Passage des cellules

- 0.05% Trypsine-EDTA (Gibco, # 25300-054) gardé à 4°C
- Versene Solution: (PBS 0.02% EDTA (m/v)) gardé à RT
- DPBS (1X) sans Ca²⁺ et Mg²⁺ (Gibco, # 10010-015) gardé à RT
- Enlever le milieu du récipient de culture
- Laver une fois avec DPBS sans Ca²⁺ et Mg²⁺
- Aspirer le DPBS (1X) sans Ca²⁺ et Mg²⁺
- Ajouter le volume de Versene pour: T25 1ml; T75 2ml ; T125 3ml
- Incuber à 37 °C pendant 40-45 min
- Ajouter le volume de 0.05% Trypsine-EDTA pour: T25 1ml; T75 2ml ; T125 3ml
- Incuber 5 min à 37 °C
- Ajouter le volume de milieu MPK pour: T25 1ml; T75 2ml ; T125 3ml
- Pipeter up/down pour dissocier les cellules
- Transférer les cellules dans un tube Falcon 50ml avec ~ le volume de milieu MPK pour:
T25 1ml; T75 2ml ; T125 3ml

- Centrifuger pendant 5 min à 1'200 rpm
- Enlever le surnageant
- Resuspendre dans le volume souhaité de milieu MPK
- Compter les cellules
- Ensemencer les cellules dans un nouveau récipient de culture
- Densité : 400'000 – 500'000 cellules pour une T75 ; 200'000 cellules pour un insert 1.12 cm²

8.3. Matériel et protocole pour la préparation du tampon Ringer HEPES

Le tampon Ringer HEPES ou RH est utilisé pour les tests de perméabilité de la barrière hématoencéphalique, car il est mieux supporté par les cellules que le PBS.

Il n'est pas disponible dans le commerce et doit donc être fait maison.

Il faut préparer au minimum 1 litre, sinon les quantités à peser deviennent trop petites pour certains composés.

Composition pour 1 litre :

Tableau 4 Composition tampon Ringer HEPES

NaCl	8.8 g
KCl	0.387 g
CaCl₂	0.244 g
MgCl₂ ; 6H₂O	0.0406 g
NaHCO₃	0.504 g
HEPES	1.19 g
Glucose	0.504 g

Marche à suivre :

- Peser tous les composants.
- Les ajouter et les dissoudre dans de l'eau stérile. (WFI for Cell Culture, USP : GIBCO A12873, normalement n'importe quelle autre eau stérile pour culture cellulaire fait l'affaire)
- Ajuster le pH à 7.4 à l'aide du pH mètre.
- Compléter le volume à 1 litre.
- Filtrer avec une unité de filtration avec des pores de 0,22 µm.

8.4. Protocole de test de perméabilité par transport de Lucifer Yellow

Pour déterminer si la barrière hémato-encéphalique est correctement établie, on peut mesurer la perméabilité de cette dernière.

Pour ce faire, on utilise un composé fluorescent qui n'est pas métabolisé par les cellules (*Lucifer Yellow*) et dont on va mesurer la quantité qui traverse la monocouche de cellules endothéliales.

La manipulation consiste donc à transférer les inserts de la coculture avec les cellules endos dans des plaques receveuses contenant un tampon Ringer HEPES (*voir protocole correspondant pour la*

préparation du tampon), puis d'ajouter au-dessus de l'insert une certaine concentration de Lucifer Yellow dilué dans ce même tampon.

On laisse ensuite le tout diffuser pendant 1h à l'incubateur, puis on mesure la quantité de Lucifer Yellow qui a traversé la barrière. Ce qui nous permettra de calculer via une feuille Excel la perméabilité et donc la bonne forme de la barrière.

Matériel :

- Plaque receveuse (*autant qu'il y a d'inserts*)
- Plaque 12 ou 24 puits pour recevoir le contenu de l'insert à la fin du transport
- Tampon Ringer HEPES (*1,5ml par puit de la plaque receveuse + 0,5ml par insert pour la dilution du Lucifer Yellow*)
- Lucifer Yellow 10mM Sigma- Aldrich L0259
- Plaque 96 puits pour les mesures à la Flexstation 3 (Molecular Device)
- Milieu de culture EGM-2 à 2% de FBS pour changer les milieu après le transport

Précisions :

Il faut impérativement avoir changé le milieu des cocultures 1 jour avant l'expérience de transport.

Le transport doit durer exactement 1h. On manipule donc les inserts par triplicats et le chrono doit démarrer après chaque transfert de Triplicat. Un triplicat est égal à une condition.

Il est préférable de noter sur chaque plaques quelles conditions vont à quelle place, afin d'éviter de se tromper et de mélanger les inserts.

Lors du transfert, les inserts doivent être manipulés très délicatement. Ceci est également le cas pour la boîte receveuse une fois le transport lancé. Cela afin d'éviter les mouvements de liquides qui augmenteraient ou diminueraient la pression au-dessus ou au-dessous de l'insert, modifiant ainsi le taux de passage du Lucifer Yellow à travers la barrière et donnant ainsi une valeur de perméabilité faussée.

Le Lucifer Yellow est sensible à la lumière. La préparation de ce dernier, ainsi que le transport en lui-même doit s'effectuer avec la lumière de la hotte éteinte. De plus, une fois le transport terminé, il faut protéger les boîtes receveuse de la lumière en les enroulant dans des feuilles d'aluminium.

Le transport peut être effectué plusieurs fois sur les mêmes cocultures. Il suffit de travailler en milieu stérile et de changer le milieu une fois l'expérience terminée.

Le plus simple est de changer le milieu lundi et de faire le transport le mardi, puis de recharger le milieu le jeudi et refaire le transport le vendredi, ce qui permet d'effectuer 2 transports par semaines en laissant assez de temps entre 2 expériences pour voir une différence. Mais libre à vous de faire comme cela vous arrange.

Le premier test de transport doit en général être fait 4-5 jours après la mise en coculture. Avant, la barrière n'est pas toujours bien établie. Et on peut continuer les transports jusqu'à 18-22 jours, voire plus après la mise en coculture si on veut vraiment avoir une vue complète de l'évolution de la barrière. Sachant qu'en règle générale, cette dernière perd ses propriétés autour de 12 jours de coculture.

Le transport prend en générale toute une matinée ou toute une après-midi. Entre la préparation des boîtes, le transport en lui-même, les mesures à la Flexstation et les calculs des perméabilités, on arrive vite à une demi-journée de travail. Sachant qu'il y a un peu moins d'une heure de battement pendant

que le transport à lieu, ce qui laisse le temps pour effectuer d'autres tâches. En tous les cas cette expérience prend du temps et nécessite d'être bien organisé.

Marche à suivre :

Mettre à chauffer le milieu EGM-2 à 2% de FBS (*ou un autre milieu selon les conditions de la coculture*)

1. Préparer les boîtes receveuse :

- Remplir autant de puits de la plaque receveuse qu'il y a d'inserts en coculture. Avec exactement 1,5ml de Ringer HEPES dans chaque puits. (*Le volume doit être très précis. Il faut donc remplir les puits avec la P1000.*)
- Noter sur la boîte receveuse les futures positions des inserts pour le transport.
- Placer la ou les boîtes receveuses à l'incubateur pour chauffer le tampon.

2. Préparer le Lucifer Yellow :

- Diluer à 1/200, dans du Ringer HEPES, la solution de Lucifer Yellow 10mM, dans un tube. (*Etape à faire avec la lumière éteinte.*)
- Il faut 0,5ml de Lucifer Yellow dilué pour chaque insert et il faut en préparer un peu plus, afin d'avoir la concentration initiale de Lucifer Yellow (T_0) essentielle pour les calculs de perméabilité. (*Le volume doit être très précis. Il faut donc remplir le tube avec la P1000.*)
- Mettre le Lucifer Yellow à chauffer au bain marie.
- Attendre que les plaques receveuses et le Lucifer Yellow soient chaudes. (*30 minutes environ*)
- Une fois ces derniers à bonne température, sortir les plaques de cocultures, ainsi que les plaques receveuses de l'incubateur et les placer côte à côte sous la hotte.
- Eteindre la lumière sous la hotte.
- Sortir le Lucifer Yellow du bain marie et le mettre sous la hotte.
- Le transport est prêt à être lancé.

3. Transfert des inserts dans les plaques receveuses :

- Les cocultures étant en triplicats, on manipule les inserts 3 par trois. (*Pas les 3 en même temps évidemment.*)
- Prendre l'insert avec une pince.
- Le retourner pour vider son contenu dans son propre puits en veillant à bien faire tomber la dernière goutte.
- Le placer délicatement, sans à-coup dans le puits correspondant de la plaque receveuse.
- Faire de même pour les 2 autres inserts du triplicat.
- Une fois le Triplicat transféré dans la plaque receveuse, ajouter très doucement exactement 500 μ l de Lucifer Yellow dans chacun des 3 inserts, afin de ne pas créer une surpression qui ferait traverser artificiellement plus de Lucifer Yellow, faussant ainsi les résultats.
- Une fois le Lucifer Yellow ajouté au troisième insert du Triplicat, le chrono peut être démarré.
- L'opération est répétée autant de fois qu'il y a de Triplicat et chaque fois qu'on termine de transférer le triplicat, on relance le chrono, si on a un chrono qui compte les tours, ou on

note simplement le temps auquel il a été transféré. Ceci permet à toutes les conditions d'avoir le même temps de transport.

- Une fois tous les inserts transférés, placer le plus délicatement possible la boîte receveuse à l'incubateur. En effet, une fois le Lucifer Yellow ajouté, il faut éviter au maximum les mouvements de liquides qui pourraient créer une pression qui pousseraient le Lucifer Yellow à travers la barrière plus fortement que normalement ou au contraire le freineraient dans sa course.
- Changer le milieu des fonds de puits des cocultures.
- Attendre 1h. (*Depuis le transfert du premier Triplicat*)
- Mettre le milieu EGM-2 à 2% de FBS à chauffer.

4. Préparation de la fin du Transport :

- Pour gagner du temps, environ 10 minutes avant la fin du transport, préparer la Flexstation pour les mesures.
- Allumer l'ordinateur à côté de la Flexstation et la Flexstation.
- Ouvrir le programme SoftMaxPro.
- Cliquer sur settings dans la « Plate#1 ».
- Cocher « Read from bottom »
- Cliquer sur « Wavelengths » et changer la longueur d'onde d'excitation à 430 et d'émission à 535 qui correspondent aux longueurs d'ondes du Lucifer Yellow.
- Le programme est prêt à lire la plaque.
- Préparer déjà la plaque de lecture 96 puits en notant l'emplacement des différentes conditions.
- Préparer une plaque pour recevoir le contenu des inserts en notant où vont les différentes conditions. En temps normal on utilise des 12 puits, mais lorsqu'il y a beaucoup de puits, une plaque 24 puits fait très bien l'affaire et permet d'économiser les plaques 12 puits.
- Deux minutes avant la fin du chrono, placer déjà les plaques sous la hotte, lumière éteinte. (*Plaque receveuse du contenu des inserts, plaque de transport et plaque de coculture*) En manipulant très délicatement la plaque de transport.
- Sortir du bain-marie le milieu EGM-2 à 2% de FBS.

5. Stopper le transport :

- Comme le démarrage du transport a eu lieu de manière décalée pour les triplicats, la fin de ce dernier a aussi lieu de manière décalée.
- Dès que les 60 minutes sont atteintes, stopper le transport en transférant à nouveau un à un les inserts du premier triplicat dans la boîte de coculture, en récupérant au passage le contenu de ces inserts dans une plaque receveuse.
- Prendre l'insert avec une pince.
- Le retirer délicatement, en un seul mouvement fluide sans à-coups.
- Vider le contenu de ce dernier dans la plaque receveuse 12 ou 24 puits.
- Replacer l'insert dans la plaque de coculture à sa position d'origine.
- Effectuer la même manipulation pour les 2 inserts restant du triplicat.
- Une fois fait, attendre que les 60 minutes se soient écoulées pour le triplicat suivant et répéter l'opération.

- Recommencer jusqu'à ce que tous les triplicats aient été remis en coculture et que tous les contenus des inserts aient été récupérés.
- Entourer les boîtes receveuses (1 contenant les fonds de puits du transport et 1 avec le contenu des inserts) avec de l'aluminium pour les protéger de la lumière jusqu'au moment de mesurer leur contenu.
- Si ce n'est pas déjà fait, remettre du milieu EGM-2 dans les inserts remis en coculture.
- Ajouter 10 μ l de FGF dans chaque insert.
- Remplacer les cultures à l'incubateur.
- Le transport est fini, il n'y a plus qu'à mesurer les quantités de Lucifer Yellow.

6. Mesurer le contenu des boîtes receveuses :

- Prendre la plaque 96 puits déjà préparée auparavant.
- Les puits de cette dernière doivent être remplis avec 200 μ l de solution.
- Le contenu des inserts est beaucoup plus concentré en Lucifer Yellow que le contenu des fonds de puits. La concentration de ce dernier est trop forte pour être correctement détecté par la Flexstation. Il faut donc diluer le Lucifer Yellow provenant du dessus des inserts avec le tampon Ringer HEPES, afin que la machine puisse le mesurer correctement.
- Commencer par la boîte receveuse qui contient la solution de Lucifer Yellow qui était au-dessus des inserts.
- Prendre 20 μ l de chaque puits et les placer dans les puits correspondant de la plaque 96 puits.
- Changer de pointe pour chaque Triplicat.
- Ne pas oublier le T0 qui est la concentration initiale de la solution de Lucifer Yellow. (= La solution de base que l'on a fait en plus et mise de côté jusqu'à maintenant.)
- Mettre 3 fois 20 μ l du T0 dans 3 puits de la plaque 96 puits, pour faire un Triplicat.
- Ajouter 180 μ l de Ringer HEPES à tous les puits qui contiennent les 20 μ l de solution pour les diluer.
- Passer à la plaque qui contient la solution de Lucifer Yellow qui était en fond de puits, en dessous des inserts. (Ce qui correspond à la quantité de Lucifer Yellow qui a traversé la barrière qui nous permettra de calculer la perméabilité de cette dernière.)
- Prendre 200 μ l de chaque puits et les placer dans les puits correspondant de la plaque 96 puits.
- Changer de pointe pour chaque Triplicat.
- Une fois tous les triplicats échantillonnés, il n'y a plus qu'à mesurer la plaque.
- Placer la Plaque 96 puits dans le tiroir de lecture de la Flexstation.
- Appuyer sur « Read » dans Soft Max Pro pour lire la plaque selon le programme déjà préparé à l'avance (430nm/535nm, excitation/emission).
- Transférer les résultats sur Excel et ou les imprimer.
- Reste à calculer les valeurs de perméabilité.

8.5. Feuille Excel pour le calcul des coefficients de perméabilité

Le schéma de la feuille Excel utilisée afin de calculer les coefficients de perméabilité est présenté dans la figure 57.

Anticorps primaires:

- ✓ Rabbit polyclonal anti-body IgG ZO-1 100 µg/400 µL Invitrogen Lot#1178757A Dilution 1:200 (Exemple)
- ✓ Mouse monoclonal antibody anti-Actin Millipore MAB1501 Lot#JBC1780750 Dilution 1:100 (Exemple)

Anticorps secondaires:

- ✓ Alexa Fluor® 488 Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) Antibody (Invitrogen, #A11008) Lot#712170 Dilution 1:200 (Exemple)
- ✓ Anti-mouse IgG TexasRed Invitrogen T862 Lot# 1156639 2mg/mL Dilution 1:200 (Exemple)

Méthode :

- **Jour 0:**
 - 150µl de milieu avec les cellules sont ensemencés sur une plaque 96 puits.
- **Jour 3:**
 - Préparation du tampon
 - Fixation dans 2% PFA pendant 10min à température ambiante
 - 3 lavages avec du PBS à température ambiante
 - Blocage dans le tampon pendant une heure à température ambiante
 - Anticorps primaire dilué dans le tampon incubé over night à +4°C
- **Jour 4:**
 - 3 lavages avec du PBS à température ambiante
 - Anticorps secondaire lié à un fluorochrome dilué dans le tampon + Hoescht (2/1000) incubé pendant 1-2 heures à température ambiante.
 - 3 lavages avec du PBS à température ambiante
 - Les photos sont prises avec le microscope confocal

8.7. Protocole de test de viabilité PI/Calcein/Hoechst

Matériel :

- Propidium Iodide (PI)
- Hoechst Dye (Invitrogen, #H3570)
- Calcein-AM
- Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS) (1X) sans Ca²⁺ et Mg²⁺ (Gibco, # 10010-015)
- Flexstation 3, Molecular Devices

Protocole :

- Calculer le volume nécessaire de solution
- Diluer le PI, la calcéine et le Hoechst dans du DPBS 1x afin d'arriver aux concentrations finales suivantes :
 - PI : 5 µM
 - Calcéine : 3 µM
 - Hoechst : dilution 1/2500
- Ajouter le volume nécessaire pour chaque puit
- Incuber 30 minutes à 37°C, 5% CO₂
- Lire la plaque avec la Flexstation 3 aux longueurs d'onde suivante :

PI : émission/excitation 535nm/617nm
Calcéine : émission/excitation 496nm/516nm
Hoechst : émission/excitation 350nm/461nm

8.8. Imageries des cellules MPK

Les cellules utilisées pour la validation du Cellware Hepia, les cellules MPK, sont imagées à la figure 58.

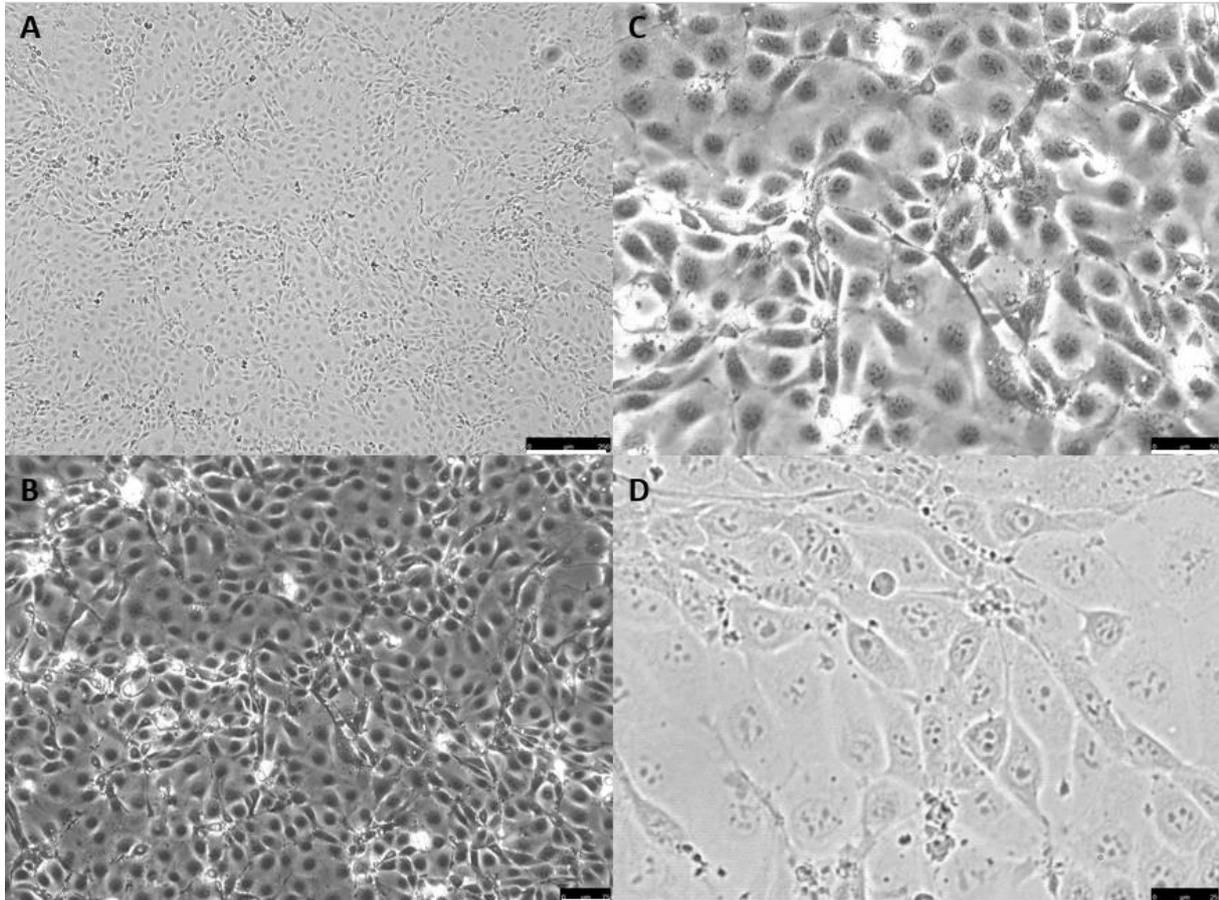


Figure 58 Cellules MPK à confluence : (A) Echelle 250 μm ; (B) Echelle 75 μm ; (C) Echelle 50 μm ; (D) Echelle 25 μm

8.9. Imageries des appareils développés en laboratoire

Les quelques appareils développés au laboratoire du Prof. Luc Stoppini sont montrés aux figures 59 à 66.

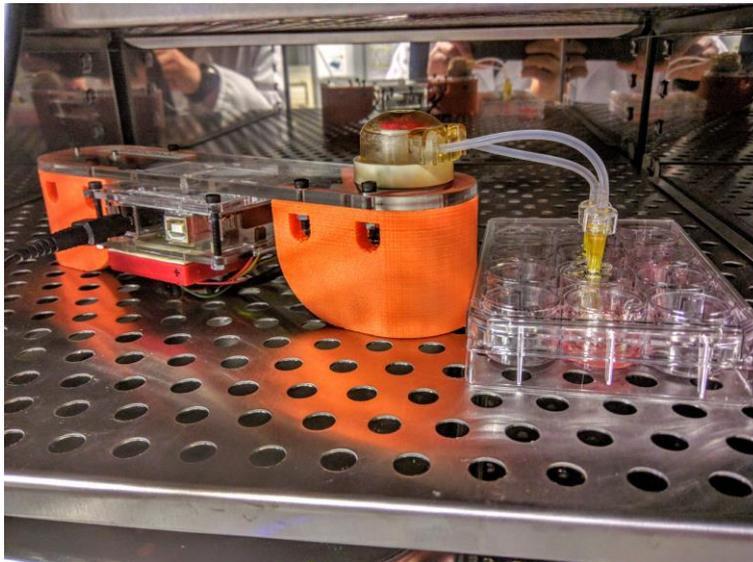


Figure 59 Système de fluide dans la chambre supérieure; pompe péristaltique RN42-E475 avec un débit de $55.4 \mu\text{l}/\text{min}$; Système commandé par Bluetooth grâce à l'application PMI développée par Hepia.

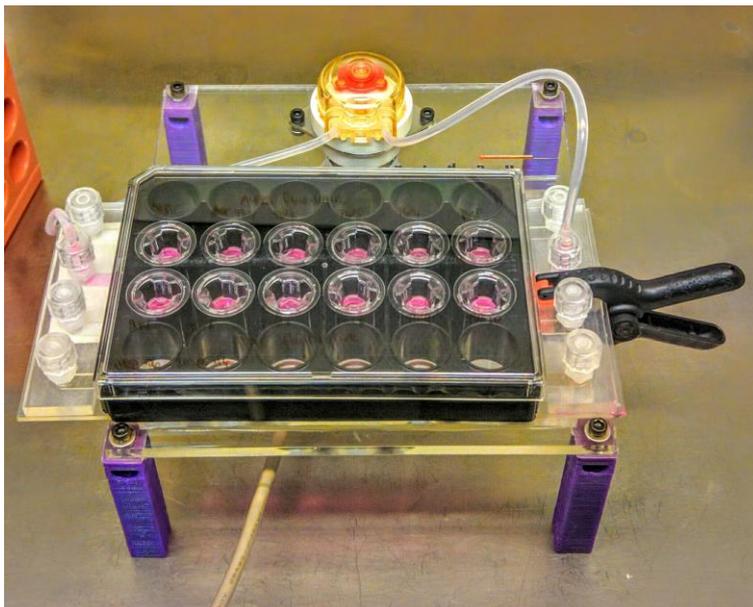


Figure 60 Système de fluide dans la chambre inférieure; pompe péristaltique E686 avec un débit de $516 \mu\text{l}/\text{min}$; Système commandé par Bluetooth grâce à l'application PMI développée par Hepia. Il s'agit d'un système uniquement de fluide ne comprenant pas la mesure de l'impédance. Celle-ci a été monitorée avec le Millicell.

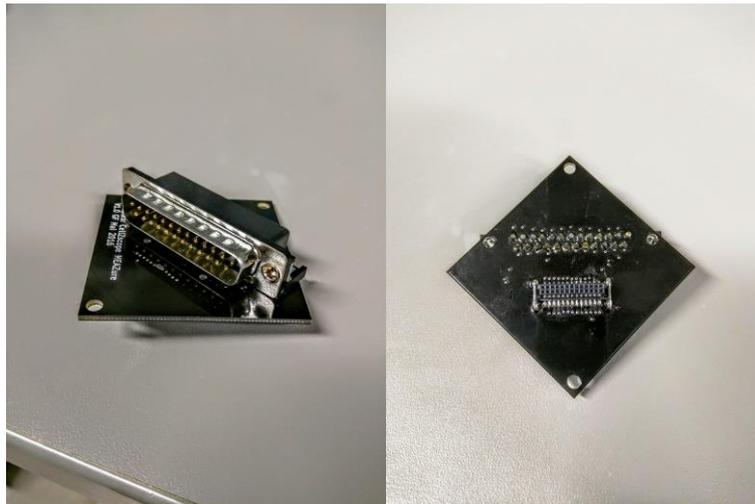


Figure 61 Connecteur fabriqué par Grégory Fischler permettant l'acquisition de données sur les mesures de la bioimpédance avec le Cellware hepia et le software CellZscope



Figure 62 Cellware Hepia (24 puits) avec mesure de la bioimpédance. Dans cette version, l'électrode du bas est reliée à l'électronique par une câble.

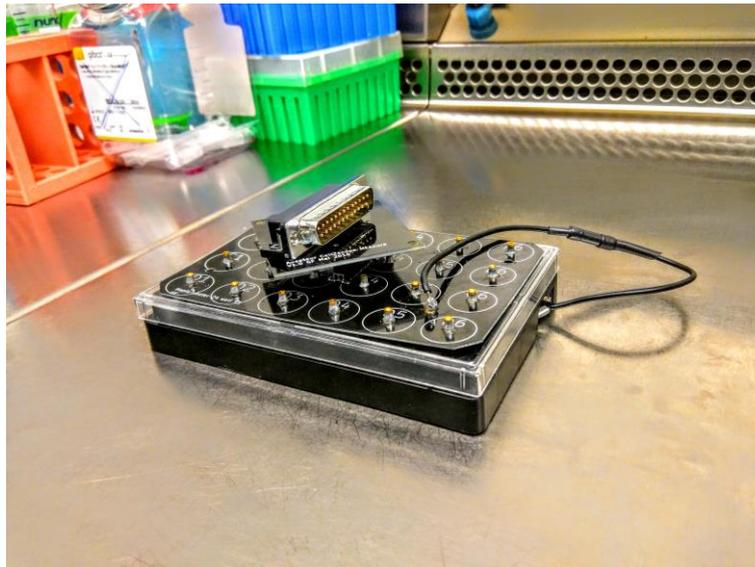


Figure 63 Cellware Hepia (24 puits) avec mesure de la bioimpédance et le connecteur permettant de se relier au software du système CellZscope

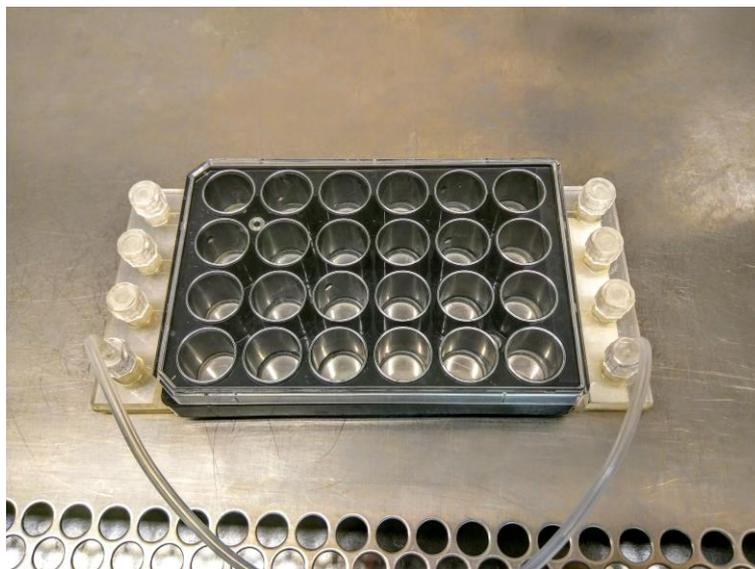


Figure 64 Cellware Hepia intégrant de la fluidique. Plaque 24 puits composée d'une électrode inférieure et un système de canaux horizontaux entre les puits.

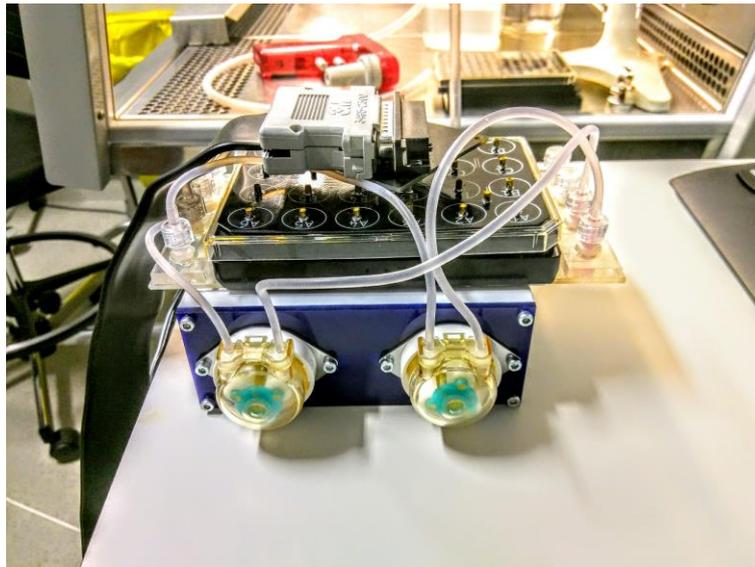


Figure 65 Système complet de monitoring du TEER intégrant de la fluidique. Deux pompes avec chacune un débit différent ($20 \mu\text{l}/\text{min}$ et $46 \mu\text{l}/\text{min}$) permettent de mettre les cellules (ensemencées en dessous de la membrane des inserts) en présence d'un flux. Un connecteur est placé sur le Cellware Hepia pour acquérir les données avec le software du CellZscope.



Figure 66 Plaque de culture 24 puits imprimée en acide polylactique (PLA) avec l'imprimante 3D Ultimaker 2

8.10. Interface de contrôle et résultats des mesures de TEER avec le programme CellZscope

Les interfaces permettant de contrôler le programme informatique pour les mesures de TEER du CellZscope ainsi que la récupération des résultats sont montrés aux figures 67 et 68.

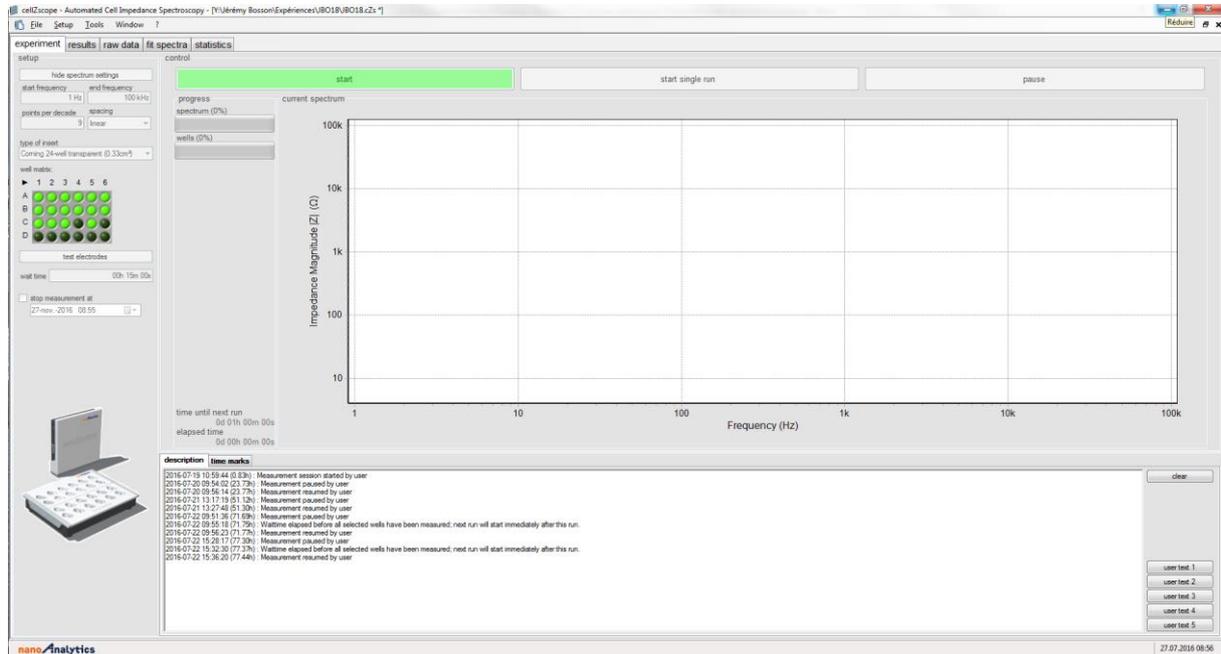


Figure 67 Interface de contrôle des mesures du TEER

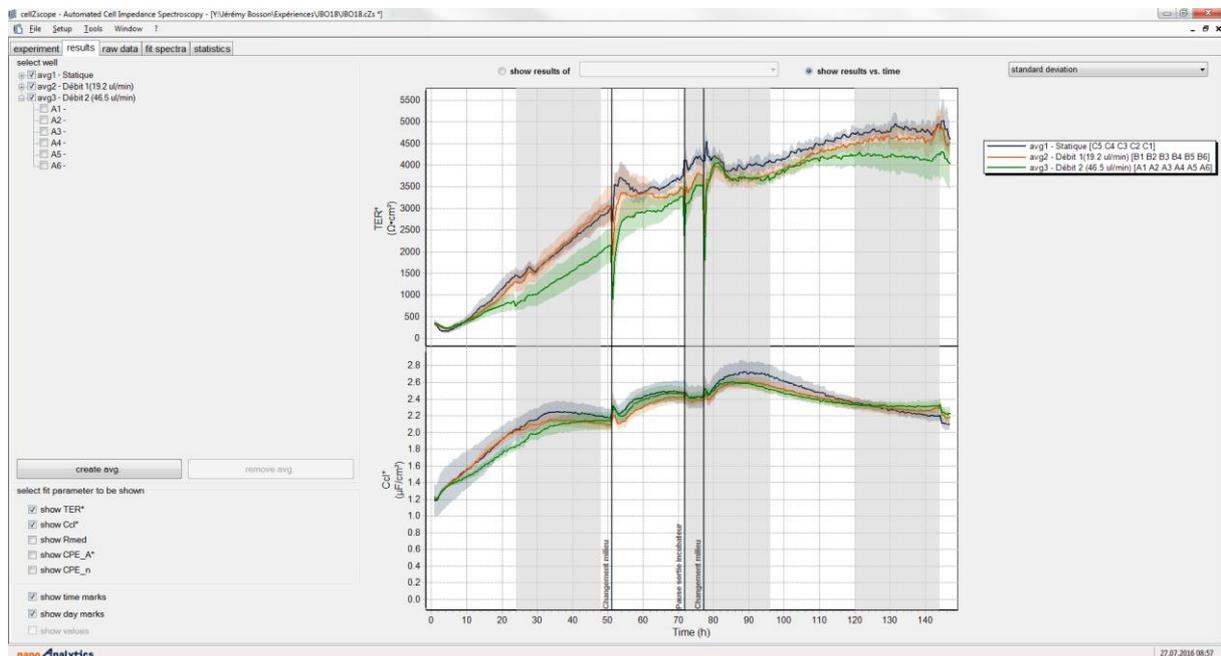


Figure 68 Interface des résultats des mesures du TEER

8.11. Impédancemètre complet (Cellware + Hardware)

Le système complet de l'impédancemètre sans fluide est présenté à la figure 69.



Figure 69 Impédancemètre complet sans fluide : Cellware Hepia et Hardware Hepia

Le système complet de l'impédancemètre avec fluide est présenté à la figure 70.



Figure 70 Impédancemètre complet avec fluide et système à deux pompes péristaltiques : Pompes péristaltiques; Cellware Hepia avec fluide et Hardware Hepia