



HAL
open science

Contrôle découlement et suivi de prolifération dans des biopuces hépatiques

Taha Messelmani, Adam Meziane, William César, Marine Verhulsel, Zied Souguir, Méryl Roudaut, Elodie Vandenhautte, Nathalie Maubon, Cécile Legallais, Eric Leclerc, et al.

► **To cite this version:**

Taha Messelmani, Adam Meziane, William César, Marine Verhulsel, Zied Souguir, et al.. Contrôle découlement et suivi de prolifération dans des biopuces hépatiques. 25^eme Congrès Français de Mécanique, Aug 2022, Nantes, France. hal-04497647

HAL Id: hal-04497647

<https://hal.science/hal-04497647v1>

Submitted on 10 Mar 2024

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Contrôle d'écoulement et suivi de prolifération dans des biopuces hépatiques

T. MESSELMANI ^a, A. MEZIANE ^b, W. CESAR ^b, M. VERHULSEL ^b, Z. SOUGUIR ^c, M. ROUDAUT ^c, E. VANDENHAUTE ^c, N. MAUBON ^c, C. LEGALLAIS ^a, E. LECLERC^{a,d}, R. JELLALI ^a, A. LE GOFF ^a

a. Laboratoire de Biomécanique et Bioingénierie - UMR 7338 CNRS UTC Alliance Sorbonne Université Centre de recherches de Royallieu, 60 200 Compiègne, France anne.le-goff@utc.fr

b. FLUIGENT 67 avenue de Fontainebleau 94 270 Le Kremlin-Bicêtre, France

c. HCS Pharma, 250 rue Salvador Allende, Biocentre Fleming Bâtiment A, 59120 Loos, France

d. Laboratory for Integrated Micro-Mechatronic Systems LIMMS/CNRS-IIS(UMI2820) Institute of Industrial Science, The University of Tokyo 4-6-1 Komaba, Meguro-ku Tokyo 153-8505, Japon

Résumé :

Les biopuces hépatiques sont des chambres microfluidiques hébergeant des hépatocytes. Ces bioréacteurs permettent d'exposer les hépatocytes, qui sont des cellules adhérentes, à un écoulement de milieu de culture qui leur apporte oxygène et nutriments. Dans ces conditions, les hépatocytes conservent leurs fonctions plus longtemps qu'en conditions statiques, ce qui offre la possibilité de les utiliser pour des applications de toxicologie prédictive avec une fiabilité optimale. Le but de ce travail est d'étudier la faisabilité d'un contrôle en pression de l'écoulement à travers une biopuce hépatique. Nous avons comparé des expériences réalisées avec des pompes péristaltiques et des contrôleurs de pression, en testant différentes conditions de culture. En fonction de la densité d'ensemencement et de la présence ou non d'un hydroscaffold, les cellules s'organisent en couches ou en sphéroïdes. Nous avons montré que le contrôle en pression permet une plus grande stabilité de l'écoulement ainsi qu'un suivi de prolifération dans la biopuce au cours de la culture qui peut se révéler utile pour un contrôle qualité des biopuces dans le cadre d'une utilisation dans des études précliniques.

Abstract :

Liver biochips are microfluidic chambers containing hepatocytes. In these bioreactors, hepatocytes, which are adherent cells, can be exposed to a flowing culture medium that provides oxygen and nutrients. Their functions are preserved for a longer time in these conditions, in comparison with static cultures. This offers the possibility of using them as in vitro models for predictive toxicology studies with an optimal reliability. The goal of the present work is to study the feasibility of a pressure control of the flow through a hepatic biochip. We compare experiments performed with peristaltic pumps and pressure controllers in different culture conditions. Depending on the seeding density and on the presence of an hydroscaffold, cells self-organize to form layers or spheroids. We showed that pressure control affords a better flow stability as well as the possibility to monitor cell growth in certain conditions, which can be a useful indicator for quality control in preclinical studies.

Mots clefs : microfluidique, culture cellulaire, pertes de charge, contrôle d'écoulement

1 Introduction

La mise sur le marché d'un nouveau médicament nécessite de nombreuses étapes, incluant des tests in vitro, des essais sur animaux puis des essais cliniques chez l'humain. Pour limiter le recours à l'expérimentation animale tout en minimisant le risque associé aux essais cliniques, on cherche à améliorer la qualité et la prédictivité des tests précliniques in vitro. Les biopuces hépatiques font partie des modèles d'étude développés dans cette optique. Il s'agit de réacteurs microfluidiques pouvant êtreensemencés par des cellules de foie et mis en culture sur de longues durées (plusieurs jours voire semaines), au cours desquelles un écoulement de milieu de culture à travers la chambre permet l'oxygénation et la nutrition des cellules, mais aussi la collecte des molécules secrétées, utilisées à des fins d'analyse [1]. Selon les conditions de préparation de la biopuce, les cellules peuvent tapisser toute la surface de celle-ci, ou en occuper le volume sous forme de sphéroïdes [2]. Nous discutons dans cet article de la façon dont l'écoulement à travers la biopuce peut être piloté dans chacune de ces situations.

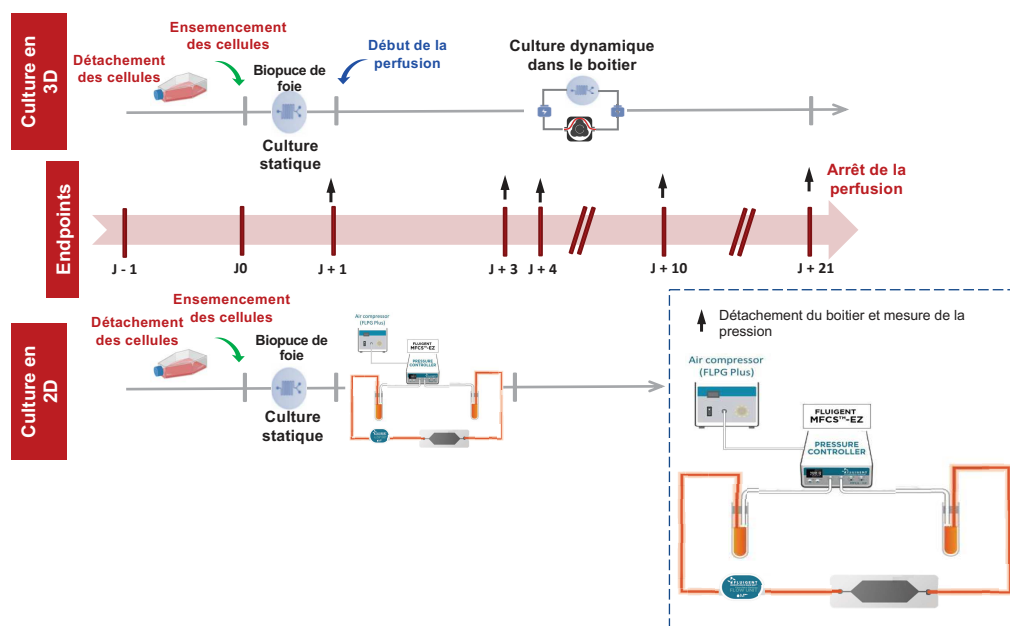


FIGURE 1 – Schéma représentant le dispositif et le plan d'expériences.

2 Contrôle d'écoulement à travers les biopuces

Le dispositif expérimental est présenté sur la figure 1. Les dispositifs sont mis en écoulement 24h après ensemencement des biopuces avec les cellules. Plusieurs puces sont utilisées en parallèle, de façon à explorer plusieurs conditions et disposer de répliqués pour chacune d'entre elles.

Pour assurer l'écoulement du liquide à travers les biopuces, il est possible d'utiliser soit un contrôle en débit, grâce à un pousse-seringue ou à une pompe péristaltique, soit de pressuriser le réservoir d'entrée. Dans le cas où l'écoulement est piloté en pression, il est possible d'utiliser un débitmètre et une boucle de rétroaction pour ajuster la consigne et fournir un débit constant. Chaque biopuce installée est entre

deux puits de culture. On note respectivement H et h les niveaux de liquide dans les puits d'entrée et de sortie. La présence d'une surface libre est importante car elle permet les échanges gazeux entre le milieu et l'atmosphère de l'incubateur qui garantissent l'oxygénation des cellules au cours de la culture.

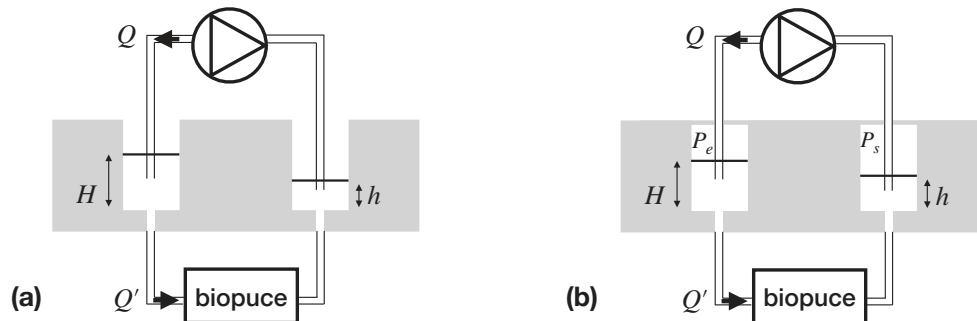


FIGURE 2 – Schéma représentant le circuit dans le cas de puits ouverts à l'air atmosphérique (a) ou dans le cas de puits installées dans un boîtier étanche (b).

Dans le cas où l'écoulement est imposé par une pompe péristaltique ou un pousse-seringue, on note Q le débit imposé par la pompe dans la partie supérieure du circuit et Q' le débit qui traverse effectivement la biopuce. En notant R la résistance hydraulique de la partie inférieure du circuit, la différence de pression entre le fond du puits d'entrée et le fond du puits de sortie s'écrit :

$$\Delta P = P_e - P_s + \rho g(H - h) = RQ' \quad (1)$$

où P_e et P_s représentent respectivement les pressions d'air dans les puits d'entrée et de sortie.

Si les puits sont ouverts à l'air atmosphérique (figure 2a), alors $P_e = P_s = P_{atm}$. Dans ce cas, l'écoulement du liquide à travers la biopuce s'accompagnant nécessairement de pertes de charge, les niveaux h et H diffèrent légèrement. Lorsque le débit-cible Q est élevé, il peut être impossible d'équilibrer RQ avec la hauteur disponible dans les puits. Diminuer la valeur de RQ en jouant sur la résistance R est difficile car la biopuce représente l'élément le plus résistif (2/3 de la résistance totale). Le débit $Q' = \frac{\rho g(H-h)}{R}$ qui traverse la puce est alors inférieur à Q , et le liquide s'accumule dans le puits d'entrée.

Lorsque les puits sont fermés de façon étanche (figure 2b), la pression P_e augmente quand H augmente, et P_s diminue quand h diminue. Ainsi, la différence $P_e - P_s$ s'ajoute au terme hydrostatique, et la différence de niveau nécessaire pour atteindre le débit ciblé est plus faible que celle estimée précédemment. C'est pourquoi il est préférable d'utiliser un système étanche tel que le boîtier CCDIM pour maintenir un débit stable au cours de l'expérience. La figure 3(a) montre le débit mesuré à travers une biopuce sans cellules, traversée par un écoulement imposé par une pompe péristaltique avec une consigne réglée à 25 $\mu\text{L}/\text{min}$. On observe que la valeur moyenne est en effet conservée au cours du temps. Il existe cependant des fluctuations considérables autour de cette valeur.

La figure 3(b) montre que contrôler l'écoulement en pression dans une biopuce vide permet d'améliorer la stabilité du débit dans le temps et de s'affranchir des fluctuations liées à la pompe péristaltique. Dans la section suivante, nous utilisons un dispositif de contrôle en pression pour piloter l'écoulement dans des chambresensemencées avec des cellules hépatiques.

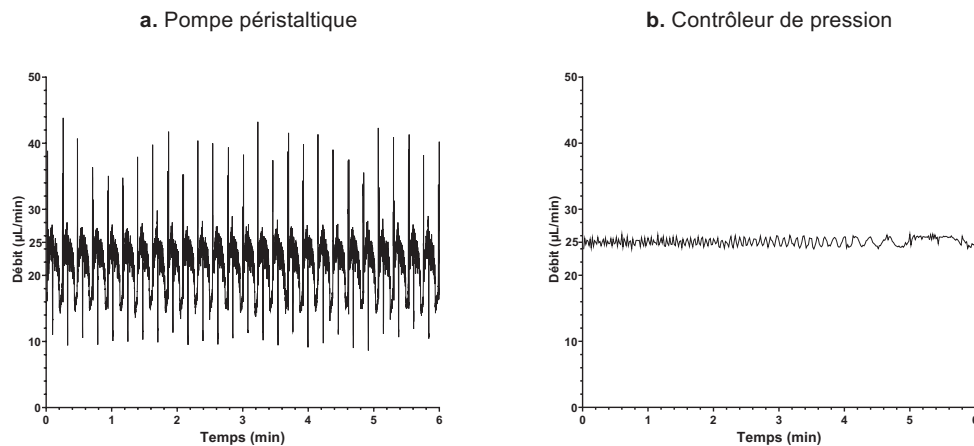


FIGURE 3 – Débit mesuré dans une biopuce vide perfusée à $25\mu\text{L}/\text{min}$ à l'aide d'une pompe péristaltique (a) ou d'un contrôleur de pression (b).

3 Culture cellulaire en couches

Dans cette partie, la paroi des biopuces est recouverte de molécules favorisant l'adhésion cellulaire. Les cellules étudiées sont des cellules de la lignée d'hépatocarcinome humain HepG2/C3A. Les biopuces sontensemencées à 250 000 cellules par puce et la consigne de débit est fixée à $10\mu\text{L}/\text{min}$.

On observe sur la figure 4(a) que la surpression à l'entrée augmente au cours du temps, alors que le débit mesuré, tracé sur la figure 4(b), reste stable. Cela traduit une augmentation de la résistance des puces, à hauteur de 50% en 3 jours de culture. Cette augmentation de résistance s'explique par la multiplication, au sein des biopuces perfusées, des cellules qui ont tendance à y former des structures multicouches : d'abord une monocouche de cellules confluentes, puis des empilements lorsque toute la surface est occupée. Nous avons cherché à savoir si cette augmentation de résistance pouvait être utilisée comme un indicateur du nombre de cellules contenues dans la puce. Pour cela, des biopuces ont été sacrifiées à différents stades de croissance et rincées avec de la trypsine pour récupérer et dénombrer les cellules adhérentes. Comme le montre la figure 4(c), nous avons en effet trouvé une relation entre la surpression P à imposer à l'entrée du circuit pour atteindre le débit-cible de $10\mu\text{L}/\text{min}$ et le nombre N_c de cellules abritées par la biopuce :

$$N_c = N_0 \left(\frac{P}{P_0} - 1 \right)$$

avec $P_0 = 10\text{ mbar}$ et $N_0 = 200\,000$ cellules (le nombre de cellules injectées initialement dans chaque puce est de 250 000). Cette observation est intéressante car elle permet un suivi de prolifération non destructif : le nombre de cellules dans la puce peut être estimé par simple lecture de la surpression imposée par le contrôleur [5].

4 Culture cellulaire en sphéroïdes

Pour mieux mimer l'organisation spatiale des hépatocytes dans le foie et prolonger leur durée de vie en culture, il est possible de remplir les puces d'un scaffold mimant la matrice extracellulaire et permettant une culture tridimensionnelle [3, 4]. Ces conditions modifient beaucoup le comportement des puces en écoulement, comme le montre la figure 6(a) : la surpression à imposer à l'entrée pour imposer un débit constant reste stable tout au long des deux semaines de culture, et ce malgré le fait que les cellules se sont

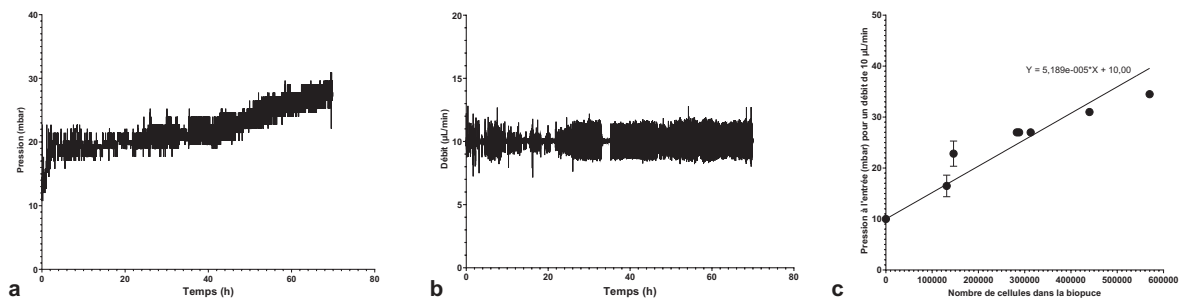


FIGURE 4 – Culture de cellules HepG2/c3a dans une biopuce couverte de collagène, avec un débit de 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ imposé par un contrôleur de pression. Evolution temporelle de la surpression en entrée (a) et du débit mesuré (b). (c) Surpression à l'entrée en fonction du nombre de cellules dénombrées dans la puce.

développées dans la biopuce. Le fait que la résistance de la biopuce soit peu affectée par la prolifération des cellules rend possible, dans cette phase de culture, le contrôle en débit, pour peu que le circuit soit correctement dimensionné.

La figure 6(b) montre des cellules HepG2/c3a cultivées pendant 14 jours dans ces conditions : on remarque que les cellules s'agrègent pour former des sphéroïdes. Cette organisation particulière, qui comporte de vastes régions pauvres en cellules et donc très peu résistives, permet au liquide de traverser aisément la biopuce malgré l'augmentation de taille des sphéroïdes.

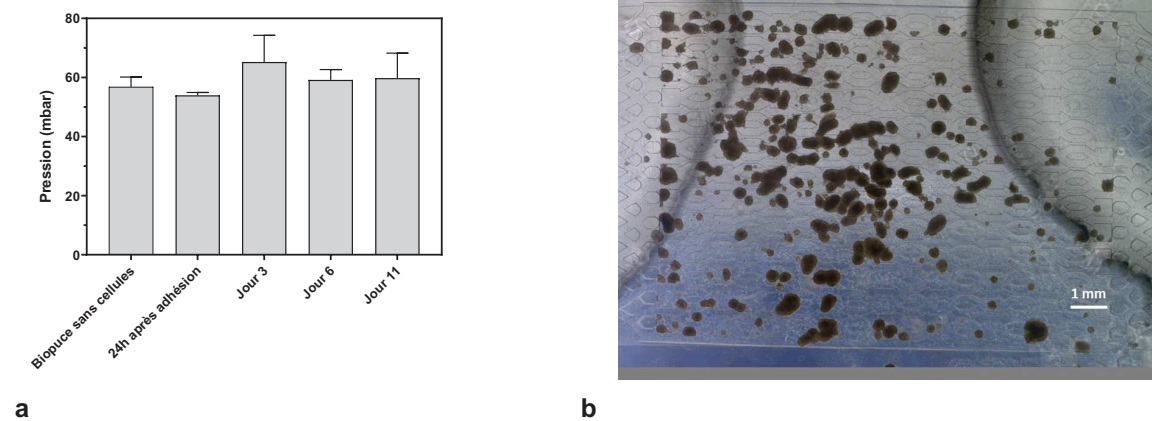


FIGURE 5 – Culture de cellules HepG2/c3a dans une biopuce remplie de Biomimesys Liver, avec un débit de 25 $\mu\text{L}/\text{min}$ imposé par un contrôleur de pression. (a) Surpression mesurée à l'entrée au cours de la culture. (b) Vue d'ensemble de la chambre de culture.

Lorsque la culture se prolonge au-delà de deux semaines, cependant, les sphéroïdes finissent par croître jusqu'au contact. Toute la biopuce est alors occupée, comme l'illustre la figure 6(a). L'absence de "couloirs" sans cellules se traduit alors par une augmentation rapide de la résistance de la puce, visible sur la figure 6(b). Pour atteindre le débit de consigne, le contrôleur de pression doit alors imposer dans le puits d'entrée une surpression élevée, de l'ordre du bar. Sous l'effet de cette pression élevée, les sphéroïdes peuvent se réarranger et l'écoulement reprendre, comme c'est le cas sur le graphe après 20 minutes, mais il arrive que les connectiques du circuit ne supportent pas les pics de pression, et la circulation de fluide dans la biopuce est alors interrompue, comme cela se produit sur le graphe au bout de 35 minutes.

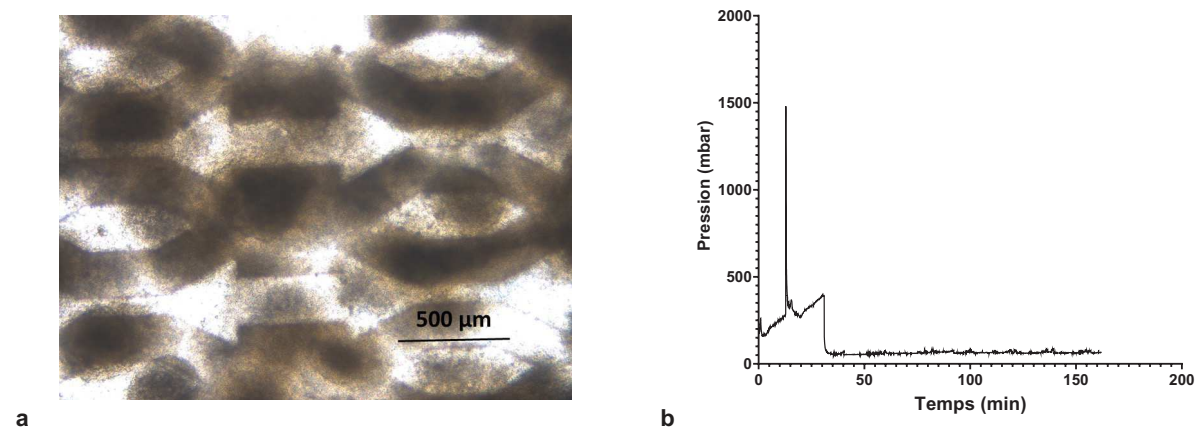


FIGURE 6 – Cellules HepG2/c3a après 19 jours de culture dans une biopuce remplie de Biomimesys Liver, avec un débit de $25 \mu\text{L}/\text{min}$ imposé par un contrôleur de pression. (a) Vue partielle de la chambre de culture. (b) Evolution temporelle de la surpression à l'entrée au cours du 19^{ème} jour de culture.

5 Conclusions

Nous avons montré que le contrôle en pression de l'écoulement dans des biopuces hépatiques permet d'obtenir un écoulement plus stable dans le temps que celui généré par une pompe péristaltique. En couplant un contrôleur de pression avec un débitmètre, il est possible de maintenir un débit-cible constant, y compris dans les situations où la résistance de la biopuce est variable en raison de la prolifération des cellules qui y sont hébergées. Dans le cas où les cellules adhèrent à la paroi de la biopuce et d'y organisent en couches, il est même possible d'utiliser la résistance de la biopuce comme un indicateur du nombre de cellules. Dans le cas où les cellules s'organisent plutôt en sphéroïdes, la résistance de la puce est peu affectée par la croissance cellulaire pendant les 10 premiers jours. Le suivi de la résistance de la biopuce peut, dans ce cas, renseigner sur des événements d'occlusion de la biopuce. Lorsque l'espace entre les sphéroïdes se réduit trop, la pression nécessaire pour maintenir le débit-cible excède les limites de résistance de la biopuce. Le suivi de résistance peut dans ce cas permettre d'écarter les données acquises après le début de la fuite.

Références

- [1] R. Baudoin, L. Griscom, J.-M. Prot, C. Legallais, E. Leclerc, Behavior of HepG2/C3A cell cultures in a microfluidic bioreactor, *Biochemical Engineering Journal*, 2 (2011)172 – 181.
- [2] L. Boulais, R. Jellali, U. Pereira, E. Leclerc, S. A. Bencherif, C. Legallais Cryogel-Integrated Bio-chip for Liver Tissue Engineering, *ACS Applied Bio Materials*, 4 (2021) 5617–5626.
- [3] T. Messelmani, A. Le Goff, Z. Souguir, V. Maes, M. Roudaut, E. Vandenhaute, N. Maubon, C. Legallais, E. Leclerc, R. Jellali, Development of an advanced liver-on-chip integrating a hydrosccaffold mimicking the liver extracellular matrix, *ACS Biomaterials Science & Engineering*, (soumis).
- [4] Method for producing hydrogel from modified hyaluronic acid and type 1 collagen, Z. Souguir, G. Vidal, E. Demange and F. Louis, WO Patent, 2016166479A1 (2016)
- [5] Pressure as a tool to evaluate cell growth, Note d'application, Fluigent (2019)