

UNIVERSITÉ DE LILLE  
**Ecole Doctorale des Sciences pour l'Ingénieur**

Année 2021

Laboratoires IEMN, LIMMS et CANTHER

THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE  
DE DOCTEUR EN MICRO ET NANO TECHNOLOGIE

**Développement d'un système de culture *in vitro* 3D et  
microfluidique pour étudier les interactions tumeur-stroma et la  
résistance aux drogues de l'adénocarcinome du pancréas**

Préparée et soutenue publiquement le 28/01/2021

par **Frédéric de MIOLLIS**

Jury :

Dr Vincent SENEZ, directeur de thèse

Dr Isabelle VAN SEUNINGEN, codirectrice de thèse

Dr Julie GUILLERMET-GUIBERT, rapporteur

Dr Stéphanie DESCROIX, rapporteur

Dr Xavier GIDROL, examinateur

Pr Fabrizio CLÉRI, examinateur et président du jury

Dr Zied SOUGUIR, invité

Dr Nathalie MAUBON, invité

Pr Teru OKITSU, invité



## Remerciements

*Cette thèse a été une véritable aventure qui m'a fait grandir tant sur le plan personnel que scientifique. Elle fut faite de rencontres, de moments de solitude et de doute mais aussi de moments merveilleux et conviviaux. Durant ce marathon qu'est le doctorat, j'ai maintes fois pensé à abandonner mais grâce au soutien et à l'encadrement dont j'ai pu bénéficier je suis allé au bout.*

Je tiens donc à remercier et exprimer ma pleine reconnaissance à :

Mes directeurs de thèse, Monsieur le Docteur **Vincent Senez** et Madame le Docteur **Isabelle Van Seuningen**, pour leur encadrement et la confiance qu'ils m'ont accordée. Merci de m'avoir permis de réaliser ces travaux de recherche à vos côtés.

Monsieur le Professeur **Teru Okitsu** qui a été un vrai guide. Ses nombreux conseils ont été primordiaux et sans lui le projet n'en serait pas où il en est. Dōmo arigatō.

**Romain Vasseur** qui m'a formé de manière très rigoureuse et transmis son savoir en biologie. Cela a été un vrai plaisir de travailler à ses côtés. Malgré son départ, il a continué à me suivre et me conseiller. Merci pour ces échanges post « boulot » autour d'un bon plat.

L'ensemble des membres de **l'équipe « IVS »** pour l'accueil et l'intégration que vous avez eue à l'égard d'un « physicien ». Un grand merci pour l'aide et les remarques pertinentes m'ayant permis d'avancer sur mon projet et de mieux comprendre la biologie.

L'ensemble des membres de **l'équipe SMMIL-E** pour leur accueil, leur mise à disposition d'équipements de pointe ainsi que pour l'aide et les remarques pertinentes m'ayant permis d'avancer sur la partie microfluidique de mon projet.

**Le personnel technique de l'IEMN** qui m'a formé au travail en salle blanche avec une grande rigueur qui a fait la réussite et la qualité de mes microfabrications.

**L'équipe d'HCS Pharma** pour sa collaboration au projet et ses nombreux conseils. Ce partenariat a été d'une grande importance pour répondre à nos difficultés.

**Meryem Tardivel et Antonino Bongiovanni** pour leur formation à la microscopie à fluorescence et l'analyse des images. Merci pour vos conseils et votre aide précieuse sur cette partie importante de ma thèse.

**Marie-Paule Ducourouble** pour sa grande aide dans la gestion des commandes qui nous soulage de cette partie et nous permet ainsi de rester concentrés sur la science.

**Delphine Taillieu** pour sa bonne humeur et son dynamisme. Elle a été pour moi la parenthèse me permettant de respirer et d'éviter la noyade. Le comble pour un nageur. Merci pour ces soutiens musicaux, culinaires et amicaux.

**Céline Brand**, ma référente formation et parcours professionnel, pour ses conseils scientifiques et personnels. Nos nombreuses discussions m'ont permis de prendre du recul, reprendre confiance en moi et de construire un projet de vie professionnel et personnel.

**Les étudiants du master biologie-santé de Lille** que nous avons accueillis durant ces 3 années pour la bonne humeur, la fraîcheur et l'envie d'apprendre qu'ils ont apportée au laboratoire.

Les étudiants internes en chirurgie **César Beugniez et Charles Poiraud** qui, en plus de leurs projets, m'ont aidé et conseillé pour mes travaux. Leurs idées ont été très innovantes et ont permis de faire évoluer le projet.

L'ensemble des stagiaires qui m'ont accompagné et aidé durant cette thèse. Leurs idées et implications dans le projet ont été très précieuses. Un grand merci à **Felix Royer, Lucie Dercourt, Camille Trzeciakowski et Joseph de Saxcé**.

**Nicolas Stoup et Vincent Girod** pour les discussions en tout genre, les conseils échangés et les services rendus. Nous partageons les mêmes encadrants mais aussi les mêmes valeurs notamment la rigueur et le respect, ce qui a rendu notre collaboration très agréable.

Le trio **Marjolaine Bauzone, Nihad Boukrout et Marie Vandeputte** pour l'ensemble de leur œuvre. Elles ont grandement participé à cette aventure humaine. Un très grand merci.

**Thomas Swierczewski** pour sa bonne humeur et sa gentillesse. Merci de m'avoir fait découvrir tant de choses dont la région à travers de magnifiques balades à vélo, des groupes de musiques, des jeux et j'en passe.

**Géraldine Tellier** pour son aide précieuse lors de l'écriture de mon manuscrit.

Enfin, je remercie **mes proches** qui me soutiennent et m'encouragent depuis de nombreuses années.

## Table des matières

Remerciements .....	3
Table des figures .....	9
Table des tableaux .....	14
Abréviations.....	15
Chapitre 1 : Introduction .....	17
I. Le pancréas .....	17
1. Anatomie .....	17
2. Fonctions.....	18
II. Le cancer du pancréas.....	18
1. Généralités.....	18
2. Les thérapies.....	20
3. Chimiorésistance.....	21
III. Le microenvironnement tumoral pancréatique .....	23
1. Composition biologique .....	23
2. Rôle dans la chimiorésistance du PDAC.....	24
3. Caractéristiques mécaniques .....	29
IV. Les modèles d'études <i>in vitro</i> microfluidiques .....	43
1. Généralités.....	43
2. L'apport de la microfluidique pour l'étude du PDAC.....	45
Objectifs du travail .....	49
Chapitre 2 : Résultats : Modélisation d'un pancréas « on-chip » .....	51
I. Objectifs.....	51
II. Choix de la géométrie et simulation numérique COMSOL Multiphysics® ...	51
1. Géométrie .....	51
2. Simulation Numérique .....	53

III.	Fabrication et optimisation du modèle d'étude .....	58
1.	Microfabrication .....	58
2.	Choix et caractérisation des lignées cellulaires pancréatiques .....	58
3.	Choix de la matrice extracellulaire .....	64
4.	Caractérisation des écoulements et du transport de masse.....	66
5.	Conditions de culture.....	68
IV.	Discussion .....	69
Chapitre 3 : Résultats : Etude des interactions tumeur-stroma et de la chimiorésistance du PDAC.....		75
I.	Objectifs.....	75
II.	Conditions de culture.....	75
III.	Modélisation du protocole FOLFIRINOX .....	76
1.	Le protocole clinique .....	76
2.	Modélisation in vitro du protocole .....	77
IV.	Etude de la viabilité cellulaire sous traitement FOLFIRINOX .....	79
V.	Etude de l'expression des marqueurs d'intérêt sous traitement avec le protocole FOLFIRINOX.....	82
VI.	Discussion .....	86
Chapitre 4 : Conclusions et Perspectives .....		95
I.	Conclusions .....	95
II.	Perspectives.....	96
Références bibliographiques .....		99
Annexe : Matériel et méthodes .....		121
I.	Microfabrication .....	123
1.	Réactifs .....	123
2.	Fabrication du dispositif.....	123
3.	Intégration de BIOMIMESYS® Oncology .....	126

II.	Culture cellulaire.....	127
1.	Conditions de culture.....	127
2.	Lignée cellulaire .....	127
3.	Réactifs .....	128
4.	Préparation des milieux de culture et DPBS 1X .....	128
5.	Décongélation .....	129
6.	Passage/Repiquage .....	129
7.	Cryoconservation .....	131
8.	Culture 3D et microfluidique .....	131
III.	Traitement des cellules par chimiothérapies .....	133
1.	Réactifs .....	133
2.	Traitements .....	133
IV.	Mesure de la viabilité cellulaire.....	134
1.	Réactifs .....	134
2.	Test MTT .....	135
3.	Test Live/Dead .....	136
V.	Immunofluorescence .....	137
1.	Réactifs .....	137
2.	Réalisation des immunomarquages fluorescents.....	137
VI.	Préparation d'extraits protéiques totaux .....	140
1.	Réactifs .....	140
2.	Extraction des protéines totales .....	140
3.	Dosage des protéines .....	141
VII.	Western Blotting .....	142
1.	Réactifs .....	142
2.	Préparation des tampons .....	143

3.	Préparation des échantillons .....	143
4.	Migration en système Invitrogen (Novex® Mini-Cell) .....	143
5.	Transfert en système liquide BioRad (Mini Trans-Blot® Cell) .....	144
6.	Saturation et incubation des anticrops .....	144
7.	Révélation .....	145
VIII.	Visualisation des écoulements et de la diffusion .....	145
1.	Réactifs .....	145
2.	Mesures .....	145
IX.	Liste des anticorps.....	146
X.	Analyses.....	147
1.	Fiji by ImageJ .....	147
2.	IMARIS.....	148
3.	Logiciel GraphPad Prism.....	149
	Annexe : Publications et communications .....	151
	Article original .....	153
	Communications orales.....	153

## Table des figures

Figure 1. Anatomie du pancréas : a) Anatomie macroscopique du pancréas b) Le pancréas exocrine c) Acinus d) Ilot de Langerhans intégré dans le tissu exocrine (adapté de Bardeesy et DePinho. 2002 [1]).....	17
Figure 2. Schéma du modèle de progression des lésions précurseurs néoplasiques PanINs [9].....	19
Figure 3. Les thérapies du PDAC (adapté de R. Vasseur. 2015 [19]) .....	21
Figure 4. Coloration au Trichrome de Masson de tissu de PDAC, bleu : stroma, violet : cellules tumorales (adapté de Meng <i>et al.</i> 2018 [40]) .....	23
Figure 5. Le microenvironnement complexe du PDAC (adapté de Samandari <i>et al.</i> 2018 [44]) .....	24
Figure 6. Modélisation de la chimiorésistance induite par les CAF. A) Chimiorésistance induite par l'activation de la voie mTOR dans les CAF grâce à la sécrétion d'IL-6, B) Augmentation de la chimiosensibilité par l'inhibition de la voie mTOR dans les CAF (adapté de Duluc <i>et al.</i> [71]) .....	27
Figure 7. Rôle des CAF dans le PDAC (adapté de Kleef <i>et al.</i> 2016 [7]).....	29
Figure 8. Propriétés mécaniques solides du microenvironnement tissulaire (adapté de Kalli <i>et al.</i> 2018 [120]).....	34
Figure 9. Modèle rhéologique newtonien et sa modélisation (amortisseur) .....	40
Figure 10. Modèle de Maxwell constitué d'un ressort et d'un amortisseur .....	40
Figure 11. Comparaison des modèles d'études existant (adapté de Sung <i>et al.</i> [168]) .....	44
Figure 12. Choix de la géométrie du dispositif microfluidique. A) Géométrie initiale, B) Simulation numérique (COMSOL Multiphysics®) : répartition de la pression lors du remplissage de la géométrie finale avec évasement, C) Géométrie finale, D) Remplissage expérimental avec du Matrigel™.....	53
Figure 13. Simulations numériques avec COMSOL Multiphysics®. A) Profil de vitesse des flux dans le système (m/s), B) Répartition de la concentration de l'oxygène (mol/m <sup>3</sup> ), C) Répartition de la concentration du glucose (mol/m <sup>3</sup> ), D) Profil de répartition de la pression (kPa).....	57

Figure 14. Morphologie et croissance des lignées cancéreuses pancréatiques humaines. Echelle 500 $\mu\text{m}$ . .....	59
Figure 15. Expression des marqueurs d'intérêt. Etude de l'expression de l'E-Cadhérine (dilution 1/1000, 97kDa), la vimentine (1/1000, 57kDa), l' $\alpha$ -SMA (1/1000, 42kDa) et la fibronectine (1/1000, 295kDa) par Western-blotting, 20 $\mu\text{g}$ d'extrait protéique ont été déposés dans chaque puits. ....	61
Figure 16. Etude de l'expression de l'E-Cadhérine et la vimentine dans les modèles cellulaires pancréatiques. Dilution des anticorps primaires 1/100 et 1/200 pour les secondaires. Co-marquages avec le Hoechst (noyau). Marquages réalisés à 100% de confluence. Imagerie confocale : échelle 50 $\mu\text{m}$ .....	62
Figure 17. Etude de l'expression de la fibronectine et l' $\alpha$ -SMA dans les modèles cellulaires pancréatiques. Dilution des anticorps primaires 1/100 et 1/200 pour les secondaires. Co-marquages avec le Hoechst (noyau). Marquages réalisés à 100% de confluence. Imagerie confocale : échelle 50 $\mu\text{m}$ .....	63
Figure 18. Activation des PSC en culture 3D. A) Culture 3D des PSC dans du Matrigel™. Observation de la migration des PSC sous le gel en le dégradant (flèche orange). B) Culture 3D des PSC dans du Matrigel™ (gauche) ou dans du collagène I (2 mg/ml) (droite). Les PSC sont désactivées dans le Matrigel™ (morphologie ronde) tandis que dans le collagène, elles forment un réseau et ont leur morphologie stellaire. Les tests Live (Calcein AM), vert) / Dead (EthD-1, rouge) attestent que les PSC sont vivantes. ....	65
Figure 19. Etude du remplissage et du maintien de la culture cellulaire dans le dispositif microfluidique en présence de différents types de matrice. ....	66
Figure 20. Caractérisation du flux interstitiel dans la matrice BIOMIMESYS® <i>Oncology</i> + collagène I. Etude de l'avancée du front de la fluorescéine (1 mg/ml) à différents temps. La vitesse d'écoulement dans le canal supérieur est de 100 $\mu\text{m/s}$ . ....	67
Figure 21. Caractérisation du transport de masse par diffusion dans la matrice BIOMIMESYS® <i>Oncology</i> + collagène I. Etude de l'avancée du front de la fluorescéine (1mg/ml) à différents temps dans le canal central. La vitesse d'écoulement dans le canal supérieur est de 100 $\mu\text{m/s}$ . En trait pointillé, la ligne d'intérêt pour calculer l'intensité lumineuse. ....	67

Figure 22. Caractérisation du transport de masse par diffusion dans la matrice BIOMIMESYS® <i>Oncology</i> + collagène I. Courbes d'intensité de la fluorescéine (1 mg/ml) à différents temps le long du canal central. La vitesse d'écoulement dans le canal supérieur est de 100 µm/s.....	68
Figure 23. Mono et co-culture 3D des PSC et des Capan-2 dans des dômes de collagène I (2 mg/ml), une densité de 2 x 10 <sup>6</sup> de cellules/ml de collagène, un ratio PS-1 : Capan-2 (3:1). .....	68
Figure 24. Modélisation de la distribution bi-compartimentale. La courbe est répartie en deux phases distinctes : la première correspond à une phase d'élimination associée à une diffusion vers les tissus (en bleu), la deuxième phase correspond à l'élimination pure (en vert). Le point où la courbe change de pente est une estimation de la concentration tissulaire maximale (flèche orange) (image de Charles Poiraud). .....	78
Figure 25. Modélisation du protocole FOLFIRINOX dans notre modèle in vitro 3D microfluidique contenant BIOMIMESYS® <i>Oncology</i> + collagène I. ....	79
Figure 26. Etude de la viabilité cellulaire dans le modèle 3D microfluidique. A) Sans traitement (NT). B) Dose IC <sub>50</sub> du protocole FOLFIRINOX. Cellules Capan-2 en monoculture et co-culture (CC) avec des PS-1. Marquage des cellules vivantes en vert avec de la Calcein AM (Live) et des cellules mortes en rouge avec du EthD-1 (Dead). 3D : culture dans un dispositif microfluidique contenant BIOMIMESYS® <i>Oncology</i> + collagène I. S : Statique, F : Fluidique. Imagerie confocale : échelle 50 µm.....	80
Figure 27. Etude de la viabilité cellulaire sous traitement FOLFIRINOX. A) courbe de survie des différentes conditions de cultures. B) IC <sub>50</sub> des différentes conditions calculées par régression non linéaire avec GraphPad. 3D : culture dans un dispositif microfluidique contenant BIOMIMESYS® <i>Oncology</i> + collagène I, S : Statique, F : Fluidique. n=3, moyenne + écart type. P < 0.01 (**) et P < 0.001 (***). .....	81
Figure 28. Etude de l'expression de l'E-Cadhérine et la vimentine, sans traitement (NT), des cellules Capan-2 en monoculture et co-culture (CC) avec des PS-1 cultivées dans un dispositif microfluidique contenant BIOMIMESYS® <i>Oncology</i> + collagène I. Dilution des anticorps primaires 1/100 et 1/200 pour les secondaires. Co-marquage avec le Hoechst (noyau). S : Statique, F : Fluidique. Imagerie confocale : échelle 50 µm. ....	82

Figure 29. Etude de l'expression de l'E-Cadhérine et la vimentine, à la dose IC<sub>50</sub> du protocole FOLFIRINOX, des cellules Capan-2 en monoculture et co-culture (CC) avec des PS-1 cultivées dans un dispositif microfluidique contenant BIOMIMESYS® *Oncology* + collagène I. Dilution des anticorps primaires 1/100 et 1/200 pour les secondaires. Co-marquage avec le Hoechst (noyau). S : Statique, F : Fluidique. Imagerie confocale : échelle 50 µm. .... 83

Figure 30. Etude de l'expression de la fibronectine et l'α-SMA, sans traitement (NT) et à la dose IC<sub>50</sub> du protocole FOLFIRINOX, des cellules PS-1 en co-culture (CC) avec des Capan-2 cultivées dans un dispositif microfluidique contenant BIOMIMESYS® *Oncology* + collagène I. Dilution des anticorps primaires 1/100 et 1/200 pour les secondaires. Co-marquage avec le Hoechst (noyau). S : Statique, F : Fluidique. Imagerie confocale : échelle 50 µm. .... 84

Figure 31. Analyse de l'expression de l'E-Cadhérine et la vimentine dans les cellules Capan-2, à la dose IC<sub>50</sub> (T) du protocole FOLFIRINOX, en monoculture et co-culture avec des PS-1 cultivées dans un dispositif microfluidique contenant BIOMIMESYS® *Oncology* et du collagène I (2 mg/ml). Résultats normalisés par rapport à l'ADN en utilisant le signal du Hoechst. S : Statique, F : Fluidique. n=3, moyenne + écart type. P < 0.01 (\*\*) et P < 0.001 (\*\*\*). .... 85

Figure 32. Analyse de l'expression de la vimentine, l'α-SMA et la fibronectine dans les cellules PS-1, à la dose IC<sub>50</sub> (T) du protocole FOLFIRINOX, en co-culture avec des Capan-2 cultivées dans un dispositif microfluidique contenant BIOMIMESYS® *Oncology* et du collagène I (2 mg/ml). Résultats normalisés par rapport à l'ADN en utilisant le signal du Hoechst. S : Statique, F : Fluidique. n=3, moyenne + écart type. P < 0.01 (\*\*) et P < 0.001 (\*\*\*). .... 85

Figure 33. Analyse de la circularité des cellules PS-1, à la dose IC<sub>50</sub> (T) du protocole FOLFIRINOX, en co-culture avec des Capan-2 cultivées dans un dispositif microfluidique contenant BIOMIMESYS® *Oncology* et du collagène I (2 mg/ml). S : Statique, F : Fluidique. n=3, moyenne + écart type. P < 0.001 (\*\*\*). .... 85

Figure 34. Courbes pharmacocinétiques du 5-FU (A), de l'oxaliplatine (B) et du SN-38 (C) adapté de Deyme *et al.* [241]. La flèche orange représente le pic de concentration. .... 87

Figure 35. Visualisation des petits noyaux hyperchromatiques des PSC sous traitement (flèche rouge)..... 92

## Table des tableaux

Tableau 1 : Propriétés mécaniques solides de différents types de cellules pancréatiques [110] .....	32
Tableau 2. Paramètres utilisés lors des simulations et adaptés de Baydoun <i>et al.</i> [191] .....	55
Tableau 3. Valeurs de la perméabilité de Darcy en fonction des matrices .....	56
Tableau 4. Masse moléculaire des molécules d'intérêt pour l'étude de la diffusion..	72
Tableau 5. Conditions de culture de notre modèle .....	75
Tableau 6. Doses des drogues associées du protocole FOLFIRINOX. La dose 1 étant la condition contrôle non traitée et la dose 5 la référence calculée <i>in vivo</i> . .....	79
Tableau 7. IC <sub>50</sub> des différentes conditions calculées par régression non linéaire avec GraphPad. Concentration des drogues associées à la dose IC <sub>50</sub> . 2D : monoculture classique sur plaque 3D : culture dans un dispositif microfluidique contenant BIOMIMESYS® Oncology et du collagène I (2 mg/ml), S : Statique, F : Fluidique...	81
Tableau 8. Comparaison du décalage de l'IC <sub>50</sub> en fonction des modèles d'études du PDAC. CC : co-culture, S : statique, F : fluidique. ....	88

## **Abréviations**

5-FU : 5-Fluorouracile	PC : Polycarbonate
$\alpha$ -SMA : alpha Smooth Muscle Actin	PDMS : PolyDiMéthylSiloxane
AKT : protéine kinase B (PKB)	PLI : Pression du Liquide Interstitiel
ARNm : Acide RiboNucléique Messenger	PMMA : Polyméthacrylate de Méthyle
ATCC : American Type Culture Collection	PS : Polystyrène
BT : Bourgeonnement Tumoral	PSC : Cellule Stellaire Pancréatique
CAF : Fibroblaste Associé au Cancer	TEM : Transition Epithélio-Mésenchymateuse
CD44 : Cluster of differentiation 44	TGF- $\beta$ : Transforming Growth Factor bêta
COC : Copolymères d'Oléfine Cyclique	TNF- $\alpha$ : Tumor Necrosis Factor alpha
CET : Cellule Endothéliale Tumorable	VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor
DPBS : Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline	
EGF : Epidermal Growth Factor	
ERK : Extracellular signal-Regulated Kinase	
FAK : Focal Adhesion Kinase	
FGF : Fibroblast Growth Factor	
GAG : Glycosaminoglycane	
HA : Acide Hyaluronique	
Hh : Hedgehog	
HGF : Hepatocyte growth factor	
IRI : Irinotecan	
MAT : Macrophages Associés aux Tumeurs	
MEC : Matrice Extracellulaire	
miARN : microARN	
M.M. : Michaelis-Menten	
mTOR : mechanistic Target Of Rapamycin	
O <sub>2</sub> : Oxygène	
OXA : Oxaliplatine	
PDAC : Adénocarcinome Canalaire Pancréatique	



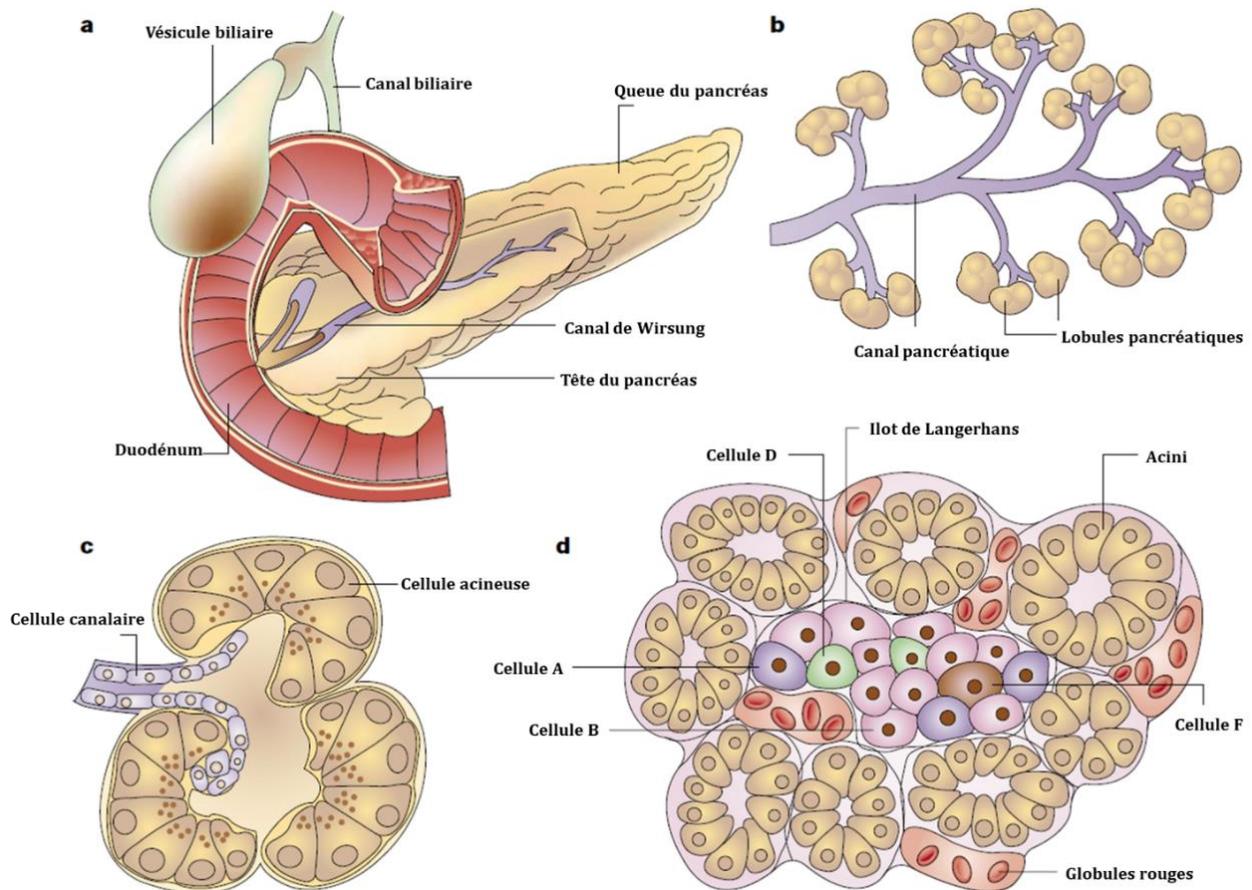
## Chapitre 1 : Introduction

### I. Le pancréas

#### 1. Anatomie

Le pancréas est situé dans la partie supérieure de l'abdomen, entre l'intestin grêle et la rate, juste derrière l'estomac à proximité du foie et de la vésicule biliaire. Il mesure environ 15 cm de long par 4 cm de large et 2 cm d'épaisseur, il est divisé en 3 parties : la tête, le corps et la queue. Ces séparations anatomiques du pancréas ne jouent aucun rôle dans la séparation fonctionnelle. En effet, les îlots de Langerhans sont dispersés dans le tissu exocrine (Figure 1).

Le canal de Wirsung, qui le traverse de la tête à la queue, permet la libération des sucs pancréatiques nécessaires à la digestion dans le duodénum. C'est un organe très vascularisé, traversé par de nombreux capillaires permettant la libération des hormones synthétisées, notamment l'insuline et le glucagon, par les îlots de Langerhans directement dans le sang.



## **2. Fonctions**

Le pancréas est un organe vital, faisant partie de la famille des glandes<sup>1</sup>, qui compose le système digestif de l'Homme. C'est une glande amphicrine ou « mixte » car elle exerce des fonctions endocrines et exocrines distinctes.

La partie endocrine, qui ne représente que 2% du tissu pancréatique, assure le rôle de régulateur hormonal majeur dans le métabolisme des glucides. Les différentes cellules endocrines<sup>2</sup> permettant la synthèse d'hormones sont regroupées en îlots appelés îlots de Langerhans. Les hormones sécrétées sont ensuite libérées dans la circulation sanguine *via* les capillaires se trouvant en périphérie des îlots.

La partie exocrine, constituée des cellules canalaire et des acini sous forme de lobules, assure un rôle essentiel dans la digestion alimentaire par la sécrétion du suc pancréatique. Il est composé d'enzymes digestives et d'une sécrétion hydroélectrolytique. Cette partie représente 80% du tissu pancréatique.

### **II. Le cancer du pancréas**

#### **1. Généralités**

Le cancer du pancréas est l'un des cancers les plus mortels avec un pronostic extrêmement sombre. En effet, le taux de survie à 5 ans reste très faible (de 3 à 9 % seulement) et la médiane de survie est de moins de 6 mois. Sa forme la plus courante est l'adénocarcinome canalaire pancréatique (PDAC) qui touche le pancréas exocrine et représente plus de 90% des cas [2]. Son incidence croissante depuis les années 70 en fait un enjeu de santé publique majeur [3]. Entre 2010 et 2019, le nombre de décès liés aux cancers du pancréas aux États-Unis a considérablement augmenté avec près de 11 000 morts en plus (36 800 en 2010, 47 050 en 2019, hommes et femmes confondus) et plus de 57 600 nouveaux cas en 2019 (données American Cancer Society 2020) [4]. En France, c'est plus de 14 000 nouveaux cas tous sexes confondus en 2019 (données INCa et SNFGE 2019). Le cancer du pancréas était la 4ème cause de mortalité liée au cancer en 2010, actuellement 3ème avec une incidence quasi-identique à la mortalité avec 458 918 nouveaux cas par an dans le monde [5]. Les

---

<sup>1</sup> Organe synthétisant une substance qui sera sécrétée dans la circulation sanguine pour les glandes endocrines, ou dans des cavités corporelles ou dans le milieu extérieur, on parle alors de glande exocrine.

<sup>2</sup> Les cellules A (synthèse du glucagon), B (insuline), D (somatostatine), F (polypeptide pancréatique) et E (ghréline).

projections le placent au 2ème rang en 2030 devant le cancer du sein et le cancer colorectal [6].

Il n'y a pas de facteurs de risque clairement associés à l'apparition du cancer du pancréas, l'âge serait un critère déterminant. En effet, la majorité des patients sont diagnostiqués après 50 ans avec un pic d'incidence vers 70-80 ans. Bien que le tabac soit l'un des facteurs les plus importants, la consommation élevée d'alcool, les diabètes de type 1 et 2, l'obésité ou le manque d'activité physique seraient aussi des facteurs favorisant les cancers pancréatiques [7]. Le facteur héréditaire est aussi à prendre en compte car 10% des patients ont des antécédents familiaux.

Le PDAC se développe à partir de trois types de lésions précancéreuses des tissus exocrines : les « Néoplasies intracanales papillaires et mucineuses (IPMNs) », les « Néoplasies kystiques mucineuses (MCNs) » et les « Néoplasies pancréatiques intraépithéliales (PanINs) » [8]. Ces dernières sont les plus courantes (90% des cas) et se développent de manière séquentielle (de la PanIN-1A à la PanIN-3). Ces stades se caractérisent par des changements morphologiques progressifs et des désorganisations architecturales de l'épithélium (Figure 2) [9]. Les lésions précancéreuses se développent à partir du tissu épithélial exocrine. Les cellules augmentent en nombre et en taille évoluant initialement d'une hyperplasie vers une dysplasie puis un carcinome *in situ* et enfin vers un carcinome invasif [10].

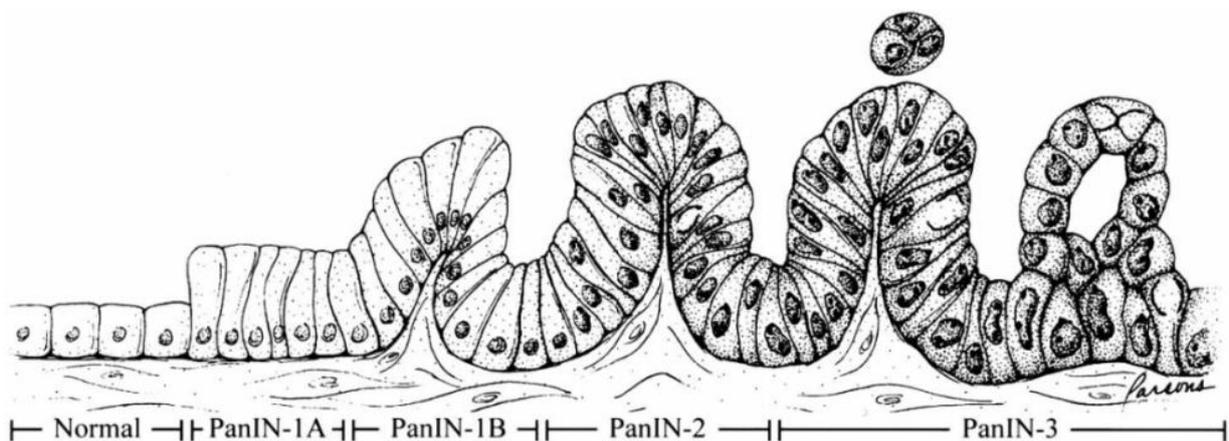


Figure 2. Schéma du modèle de progression des lésions précurseurs néoplasiques PanINs [9]

## **2. Les thérapies**

### **a. La chirurgie**

Il n'existe actuellement aucun traitement efficace pour le cancer du pancréas, la chirurgie est le seul traitement curatif proposé à ce jour [11]. En raison d'un diagnostic tardif dû au manque de moyens de détection précoce et d'un développement asymptomatique de la pathologie, seulement 15 à 20% des patients peuvent bénéficier d'une résection chirurgicale qui consiste principalement à ôter la tête du pancréas et à un remaniement complexe du système digestif [12]. Malheureusement, avec cette thérapie le taux de survie à 5 ans reste inférieur à 20% et la médiane de survie est d'environ 20 mois [13]. Il est important de noter que cette intervention s'accompagne de nombreuses complications et qu'il existe un taux de rechute important. C'est pourquoi la chirurgie est suivie de traitements adjuvants comme la radiothérapie ou la chimiothérapie (Figure 3).

Pour la majorité des patients (80%), la chirurgie n'est pas possible car ils sont diagnostiqués à un stade où les lésions cancéreuses sont localement avancées ou métastatiques [14].

### **b. La chimiothérapie**

Pour les patients ne pouvant être opérés, le traitement proposé est la chimiothérapie palliative associée ou non à la radiothérapie [15]. Le premier agent chimiothérapeutique actif était le 5-Fluorouracile (5-FU), jusqu'en 1995, c'était alors le seul traitement pour le cancer du pancréas. La médiane de survie avec ce traitement était de 4,41 mois [16]. Par la suite, un traitement à base de gemcitabine GEMZAR® a permis d'augmenter la médiane de survie à 6,8 mois. La gemcitabine est actuellement le traitement de référence pour les cancers du pancréas avancés. Plus récemment, le protocole FOLFIRINOX combinant 4 molécules (l'oxaliplatine (OXA), l'irinotecan (IRI), le 5-FU et l'acide folinique (leucovorine - FOL)) a été proposé en clinique. Par rapport au traitement par la gemcitabine, les résultats sont plus prometteurs avec une augmentation de la médiane de survie à 11,1 mois [11], [17]. Enfin, le paclitaxel combiné à la gemcitabine a permis d'augmenter la survie des patients à 8,7 mois contre 6,6 mois avec la gemcitabine seule [18]. Toutefois ces 2 derniers traitements sont lourds et seuls les patients en « bonne santé » peuvent en

bénéficiaire (âge < 76 ans, score ECOG<sup>3</sup> de 0 ou 1, pas d'ischémie cardiaque et un niveau de bilirubine normal). La chimiothérapie peut aussi être utilisée en protocole néo-adjuvant dans les cas d'une tumeur à la limite résecable localement avancée mais non métastatique. Par la suite, si les signes sont favorables, le patient peut bénéficier d'une chirurgie (Figure 3).

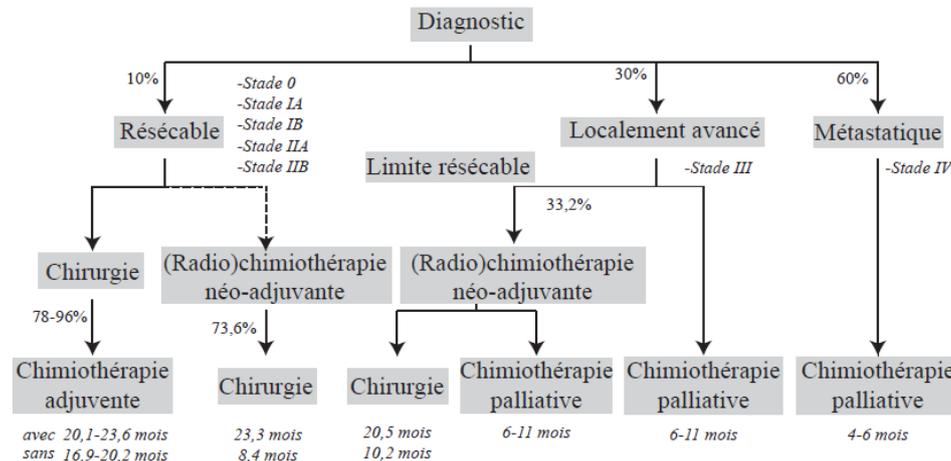


Figure 3. Les thérapies du PDAC (adapté de R. Vasseur. 2015 [19])

### 3. Chimiorésistance

Malgré des progrès dans la prise en charge des patients, les thérapies actuelles n'ont pas l'efficacité espérée. Ceci est dû à la forte chimiorésistance observée dans le PDAC. Cette chimiorésistance est divisée en deux catégories, elle peut être une propriété intrinsèque mais également être acquise en cours de traitement [20], [21]. L'acquisition des propriétés de résistance aux drogues est régulée par divers facteurs tels que : la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM), les microARN (miARN) et le microenvironnement tumoral. On peut également ajouter les mécanismes concernant les transporteurs de drogues, les enzymes d'activation et d'inactivation et leurs cibles.

La TEM est une phase de changement phénotypique des cellules tumorales qui favorise un phénotype mésenchymateux plus agressif. Ce processus s'accompagne généralement de modifications morphologiques des cellules cancéreuses et de modifications des niveaux du génome et des protéines. Il est médié par de nombreux gènes et voies de signalisation cellulaire. Des travaux ont démontré que l'inhibition du

<sup>3</sup> ECOG: Eastern Cooperative Oncology Group (Oken et al. 1982)

- Score de 0 : Entièrement actif, capable de continuer toutes les performances pré-maladie sans restriction.  
- Score de 1 : Restreint à une activité physique intense mais ambulatoire et capable d'effectuer un travail de nature légère ou sédentaire.

processus de TEM a entraîné une amélioration de l'expression des transporteurs de nucléosides dans les tumeurs, augmentant ainsi la sensibilité à la gemcitabine [22]. Il est possible d'inverser la TEM en réduisant au silence certains gènes/protéines. Cette méthode a restauré l'expression des gènes épithéliaux typiques, et a également augmenté la sensibilité des cellules aux agents thérapeutiques, suggérant que ces gènes/protéines et d'autres facteurs régulateurs de la TEM maintiennent la résistance aux drogues dans les cellules cancéreuses pancréatiques humaines [23], [24].

De plus, la TEM est corrélée au phénomène de bourgeonnement tumoral (budding tumoral – BT), qui est un facteur de mauvais pronostic du PDAC [25]. Il est possible d'observer le même processus qui permet aux cellules épithéliales tumorales d'acquérir le phénotype mésenchymateux (augmentation de l'expression de marqueurs mésenchymateux (vimentine, Zeb1/2) et réduction de l'expression de marqueurs épithéliaux (E-Cadhérine, cytokératines), augmentant ainsi leur capacité de migration et d'invasion, les aidant à développer une résistance aux chimiothérapies [26]–[28].

Les miARN sont une classe de petits ARN non codants de 19 à 25 nucléotides qui régulent négativement les gènes au niveau post-transcriptionnel [29]. Ils sont capables de se fixer sur les ARN messagers (ARNm) pour moduler leur expression. N'ayant pas la capacité de coder une protéine, les miARN se lient principalement aux régions non traduites de leurs ARNm cibles. Les conséquences de cette liaison sont que l'ARNm ne s'exprime pas ou est dégradé, entraînant ainsi une diminution de l'expression de la protéine associée. Un nombre croissant de publications au cours des dernières années montre une corrélation entre l'expression des miARN dans le PDAC et la résistance ou la sensibilité aux cibles chimiothérapeutiques. Par exemple, le traitement à base de gemcitabine conduit à une régulation positive ou négative de divers miARN et donc de l'expression des protéines apparentées entraînant une chimiorésistance du PDAC [30]–[34].

Le microenvironnement tumoral fait l'objet d'une grande attention en raison de sa composition cellulaire variée et des voies de signalisation associées. Il joue un rôle central dans le développement du PDAC et apporte également une contribution importante au processus de chimiorésistance [35]–[38]. Cet aspect nous intéressera particulièrement dans ce manuscrit.

### III. Le microenvironnement tumoral pancréatique

#### 1. Composition biologique

Le microenvironnement tumoral pancréatique est composé d'un stroma desmoplastique ou fibro-inflammatoire abondant (Figure 4), dense et riche en collagène I, comprenant des concentrations extrêmement élevées en acide hyaluronique (HA), qui crée une situation hypoxique pour les cellules cancéreuses [39]. Ce stroma est composé de protéines de la matrice extracellulaire (MEC) ainsi que des glycoprotéines, des protéoglycanes et des glycosaminoglycanes (GAG). D'autres facteurs présents dans le stroma, comme les facteurs de croissance et les cytokines, régulent les interactions des cellules cancéreuses avec la MEC.

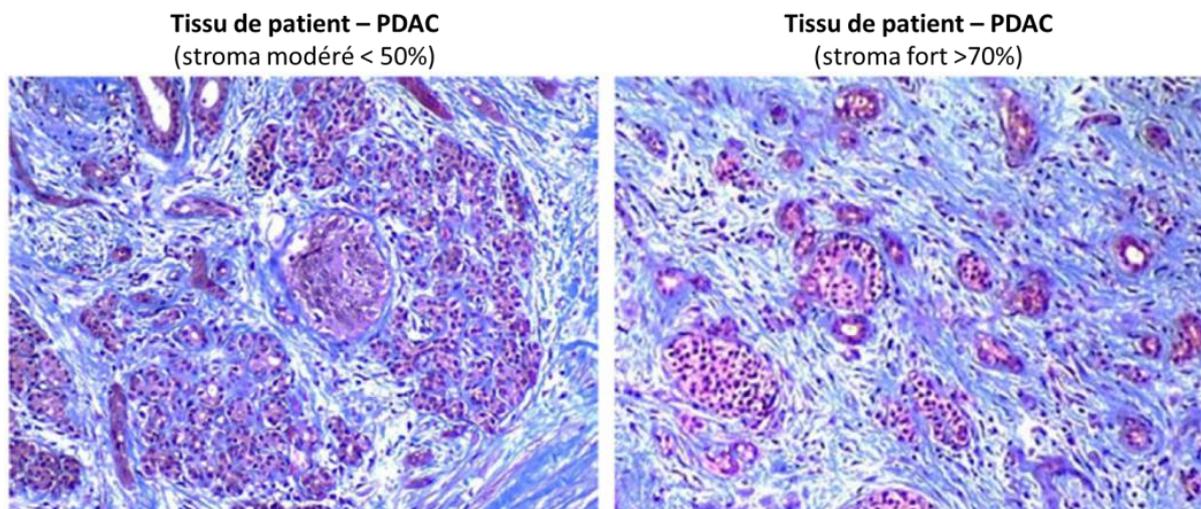


Figure 4. Coloration au Trichrome de Masson de tissu de PDAC, bleu : stroma, violet : cellules tumorales (adapté de Meng *et al.* 2018 [40])

La composition cellulaire du stroma comprend les cellules stellaires pancréatiques (PSC), qui produisent la matrice de collagène (les PSC activées sont également connues sous le nom de fibroblastes associés au cancer (CAF)), les cellules immunitaires, les cellules endothéliales et les cellules neuronales (Figure 5) [41], [42]. Les cellules immunitaires présentes dans le microenvironnement du PDAC comprennent les lymphocytes T, les cellules myéloïdes suppressives, les macrophages et les mastocytes [43].

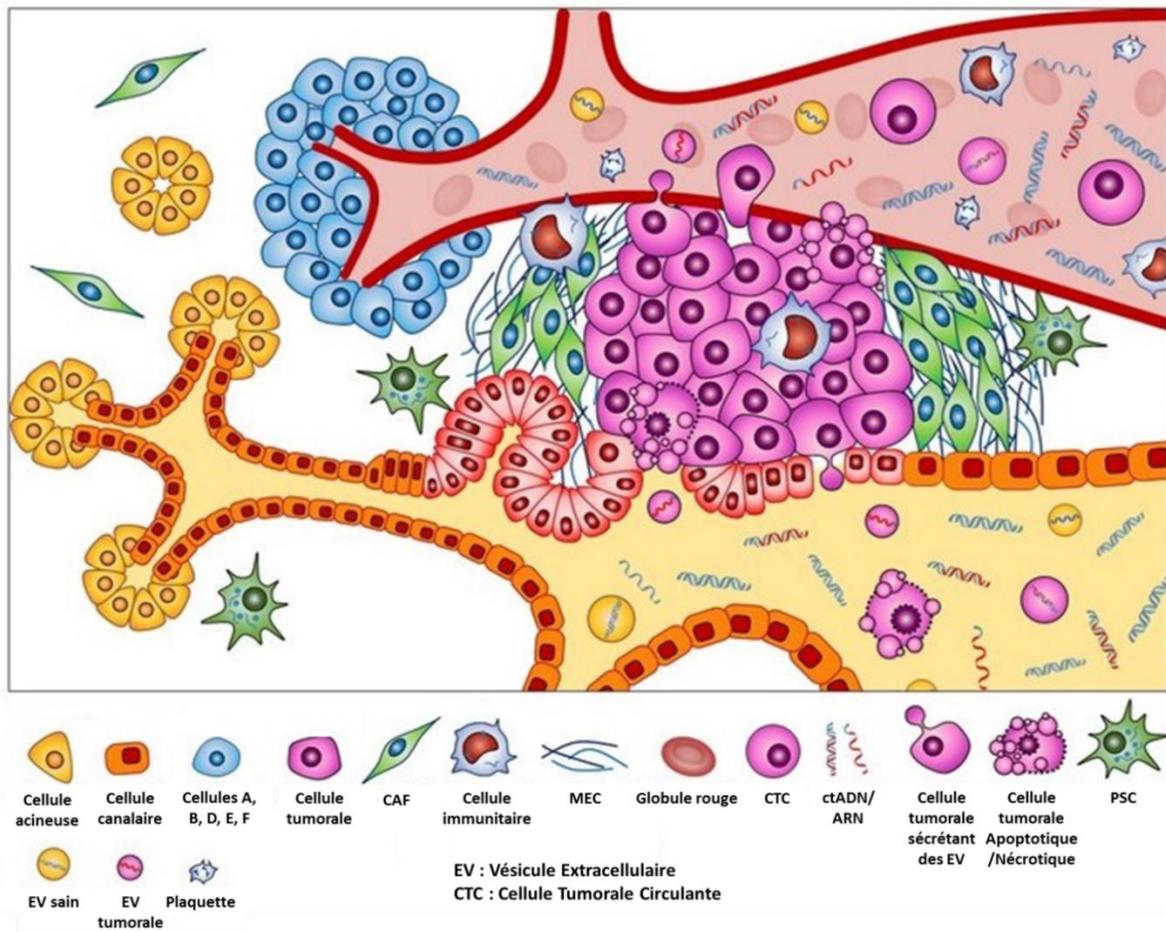


Figure 5. Le microenvironnement complexe du PDAC (adapté de Samandari *et al.* 2018 [44])

## 2. Rôle dans la chimiorésistance du PDAC

### a. La composante matricielle : la matrice extracellulaire

La matrice extracellulaire (MEC) du PDAC est composée de nombreuses protéines, dont différents collagènes, la fibronectine et la laminine, produites par tous les types cellulaires du microenvironnement tumoral et forme un réseau fibreux caractéristique de la desmoplasie<sup>4</sup>. La MEC joue un rôle important dans la capacité des cellules tumorales à proliférer, migrer et métastaser mais affecte également la sensibilité aux traitements. En effet, la desmoplasie altère l'architecture du tissu sain induisant une configuration anormale des vaisseaux sanguins et lymphatiques [45]–[47]. La MEC agit comme une barrière physique rigide qui comprime les vaisseaux sanguins provoquant une hypovascularisation et une réduction de la diffusion des drogues dans la tumeur [48], [49]. En effet, la distance des lits vasculaires aux cellules tumorales est cruciale pour l'acheminement des chimiothérapies au sein de la tumeur [50].

<sup>4</sup> Définition : forte croissance des tissus fibreux provoquant une fibrose dense autour de la tumeur

## **b. La composante cellulaire**

### **Les cellules endothéliales**

L'angiogenèse<sup>5</sup> est essentielle à la progression du PDAC notamment dans la croissance et la métastase tumorale [51]. Par rapport aux cellules endothéliales saines, les cellules endothéliales tumorales (CET) possèdent des caractéristiques différentes en termes de prolifération, de migration, de réponse aux facteurs de croissance (notamment le VEGF sécrété par les cellules tumorales et les CAF) et aux chimiothérapies [52], [53]. Ces modifications structurelles et fonctionnelles entraînent des zones d'hypoxie et un apport nutritionnel limité au sein de la tumeur. L'hypoxie modifie l'expression des gènes des cellules tumorales, augmentant ainsi la survie cellulaire et la résistance à l'induction de l'apoptose.

Des études ont montré que les cellules tumorales déclenchent les activités immunosuppressives des CET qui influencent l'immunité anti-tumorale et la réponse thérapeutique [54]. Les CET permettent également la transmigration des cellules myéloïdes immunosuppressives du sang vers la tumeur et altèrent les réponses immunitaires anti-tumorales [55]. Elles entraînent également la suppression ou l'altération des fonctions des lymphocytes T par l'expression de molécules inhibitrices (PDL1/2) et la libération de facteurs solubles (TGF- $\beta$ , VEGF) [56], [57].

### **Les cellules immunitaires**

Les cellules immunitaires innées (comme les macrophages, les mastocytes ou les cellules myéloïdes suppressives) et les cellules immunitaires adaptatives (les lymphocytes T) sont présentes dans le microenvironnement tumoral et interagissent avec les cellules tumorales par contact direct ou indirect *via* les chimiokines et les cytokines. Ces interactions jouent un rôle majeur dans le comportement de la tumeur et sa réponse aux traitements. En effet, les cellules immunitaires peuvent à la fois promouvoir et enrayer l'efficacité thérapeutique [49]. Elles représentent environ 50% de la masse cellulaire tumorale [43].

Les macrophages associés aux tumeurs (MAT) sont des régulateurs clés de la réponse thérapeutique dans le microenvironnement tumoral. Ils sont classés en sous-types M1 et M2 en fonction de leur état de polarisation. Les macrophages M1 sont

---

<sup>5</sup> Définition : formation de nouveaux vaisseaux sanguins

activés par les cytokines Th1. Tandis que les macrophages M2 se différencient en réponse aux cytokines Th2 [58], [59]. Dans cette association aux tumeurs, les macrophages M1 sont considérés comme tumoricides, alors que les macrophages M2 tumorigènes. Des études *in vitro* et *in vivo* dans différents cancers ont montré que les MAT médient la résistance à certains agents chimiothérapeutiques comme le 5-FU, la gemcitabine, le paclitaxel, ou des sels de platine [60]–[63]. De plus, ils acquièrent également la capacité de produire plusieurs cytokines suppressives telles que les interleukines IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 et le TGF- $\beta$ , contribuant à la suppression des lymphocytes T dans le microenvironnement tumoral [58].

Les cellules myéloïdes suppressives prolifèrent au cours de la tumorigenèse et ont la capacité de supprimer diverses réponses des lymphocytes [64]. Elles peuvent également migrer vers la tumeur, où elles s'y différencient en MAT. Elles jouent un rôle essentiel dans la résistance à certains traitements anticancéreux [65], [66].

### **Les cellules stellaires pancréatiques**

Les cellules stellaires pancréatiques (PSC) sont les principales composantes cellulaires du stroma et sont des régulateurs clés de la composition et l'organisation de la MEC. Elles sont inactives dans les tissus sains mais peuvent être activées en CAF par des facteurs sécrétés par les cellules tumorales, tels que le TNF- $\alpha$ , le TGF- $\beta$ , le FGF ou les interleukines [41]. Une fois activée, les CAF déclenchent une réponse chronique semblable à la cicatrisation des plaies envers les cellules cancéreuses, conduisant à une accumulation excessive de protéines de la MEC citées auparavant, ainsi que des cytokines et des facteurs de croissance, et exercent des forces contractiles modifiant l'architecture tissulaire [67]. Les CAF présentent également une prolifération et une migration accrues. Un des marqueurs caractéristiques d'activation des PSC en CAF est l' $\alpha$ -SMA. Différentes études cliniques ont montré qu'une forte expression d' $\alpha$ -SMA était associée à de moins bons pronostics cliniques que les tumeurs avec de faibles niveaux d'expression [68]. En plus de l' $\alpha$ -SMA, l'activation des PSC en CAF induit une expression de collagène de type I, de TGF- $\beta$  et d'autres protéines impliquées dans la prolifération cellulaire, la migration, le remodelage de la MEC, la TEM et l'inflammation [69]. De plus, les tumeurs avec une signalisation TGF- $\beta$  perturbée présentent une fibrose périductale accrue, une forte rigidité tissulaire et un mauvais pronostic [70]. Une fois activés par les cellules tumorales, les fibroblastes ont tendance à acquérir un phénotype constamment activé en réponse à plusieurs

facteurs de croissance sécrétés par les cellules cancéreuses hautement prolifératives, notamment le TGF- $\beta$ . Ils peuvent ainsi induire la prolifération des cellules cancéreuses, tout en diminuant l'apoptose de celles-ci, facilitant ainsi leur survie. Les CAF stimulent également la migration des cellules tumorales, un effet associé à une accentuation de la TEM expliquée auparavant [41].

Plusieurs études ont rapporté une augmentation des phénotypes métastatiques des cellules tumorales lorsqu'elles sont co-cultivées avec des CAF. Les interactions entre les CAF et les cellules tumorales pancréatiques sont bidirectionnelles et présentes dans les processus de prolifération, de migration et de chimiorésistance du PDAC. Ces interactions ont été démontrées à la fois *in vivo* et *in vitro* [36], [38], [41]. Une étude a montré que l'inhibition de la voie mTOR/4E-BP1 (très active dans les CAF) dans des modèles de xénogreffes<sup>6</sup> (Figure 6), induit une diminution de la croissance tumorale, de la fibrose et de la chimiorésistance entraînant ainsi une augmentation de la mort cellulaire par la gemcitabine [71]. De même, inhiber les voies de signalisation Notch, AKT ou ERK1/2, impliquées dans les processus de prolifération, de migration et d'invasion des CAF et des cellules tumorales, induit une diminution de la chimiorésistance du PDAC [36], [37], [41], [72].

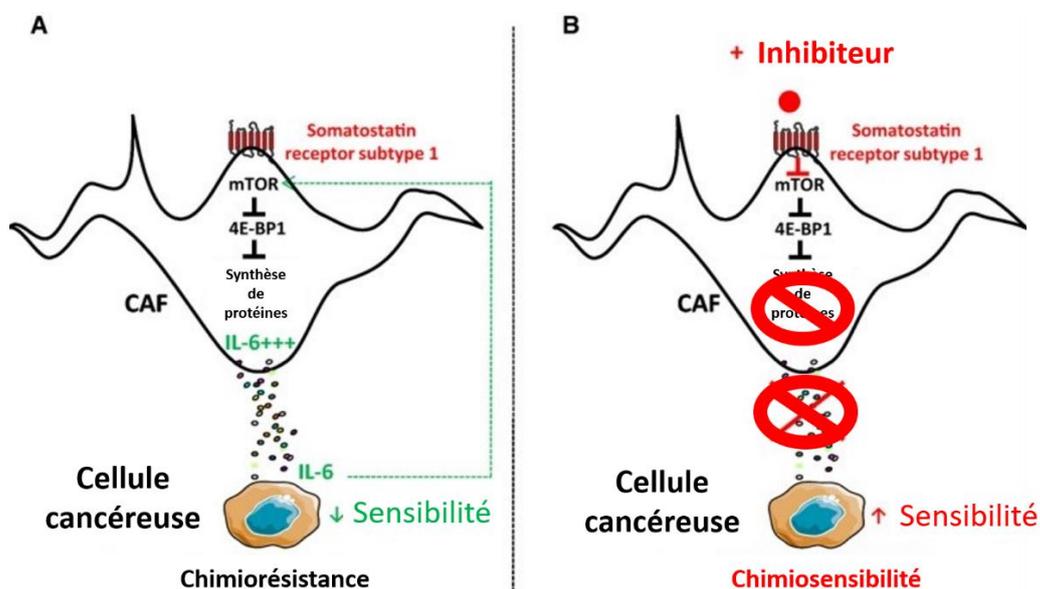


Figure 6. Modélisation de la chimiorésistance induite par les CAF. A) Chimiorésistance induite par l'activation de la voie mTOR dans les CAF grâce à la sécrétion d'IL-6, B) Augmentation de la chimiosensibilité par l'inhibition de la voie mTOR dans les CAF (adapté de Duluc *et al.* [71])

<sup>6</sup> Xénogreffes soit avec des cellules cancéreuses pancréatiques humaines (MiaPaCa-2 ou Panc-1, par voie orthotopique ou sous-cutanée) avec ou sans CAF, soit avec des morceaux de résections de tumeurs pancréatiques humaines (PDX sous-cutanée) dans des souris Pdx1-Cre;Kras<sup>G12D/+</sup> (NMRI-nu/nu, NMRI-Foxn1nu)

L'activation de la voie Hedgehog (Hh) a un impact sur la motilité et la différenciation des CAF et affecte ensuite la croissance tumorale en favorisant la formation de desmoplasie [73]–[76]. Dans un même temps, l'activation de la voie Hh augmente la production de MEC et son inhibition induit une diminution de l' $\alpha$ -SMA, donc une réduction de la MEC qui favorise la vascularisation de la tumeur, améliorant ainsi l'accès aux perfusions sanguines de chimiothérapies [72]. Il a été démontré que la voie Hh stimule la progression du cancer en modulant la prolifération des cellules cancéreuses, la malignité, les métastases et l'expansion des cellules souches cancéreuses [77]–[80]. Le blocage de la voie Hh entraîne une diminution de la prolifération et de la chimiorésistance à la gemcitabine du PDAC [81].

De nombreuses propriétés liées à la chimiorésistance sont dues aux CAF comme l'inhibition de l'apoptose des cellules tumorales, l'augmentation de l'expression des marqueurs de cellules souches dans les cellules tumorales, la formation de niches de cellules souches cancéreuses chimiorésistantes, leur capacité de migration depuis une tumeur primaire vers des sites métastatiques distants afin d'y favoriser l'ensemencement et la croissance de cellules cancéreuses métastatiques (Figure 7) [82], [83].

Enfin, les CAF favorisent l'angiogenèse en sécrétant des facteurs de croissance, aidant les cellules tumorales à atteindre les vaisseaux sanguins et à métastaser vers des sites distants [84], comme les VEGF et/ou l'HGF [83] et contribuent à l'évasion immunitaire *via* un processus en cascade complexe touchant l'intégralité du stroma (Figure 6) :

- Apoptose des lymphocytes T [85]
- Migration dans le stroma des cellules myéloïdes suppressives [86]
- Dégranulation des mastocytes entraînant la libération de facteurs stimulant la prolifération des CAF et la production de cytokines par les macrophages conduisant à une activation supplémentaire de PSC [87], [88]

La population de PSC qui contribue au dépôt et au remodelage de la MEC au sein de la tumeur est hétérogène [89], [90]. De ce fait, le rôle des PSC dans la croissance tumorale est encore incertain et sa contribution dépendrait en réalité du contexte [70]. En effet, des études ont montré que le stroma a un rôle protecteur dans le PDAC et que le ciblage des PSC et la réduction du stroma ont conduit à une augmentation du comportement invasif des cellules tumorales [91], [92]. La divergence de ces résultats

démontre que l'influence du stroma dépend du contexte mais aussi de l'hétérogénéité des PSC. Elles seraient à la fois un facteur de promotion et d'inhibition de la progression du cancer [90]. Par exemple, au cours de la tumorigenèse précoce, une régulation positive du stroma produit par les PSC pourrait refléter la tentative d'isoler les cellules tumorales, mais aux stades ultérieurs, les cellules cancéreuses peuvent être capables de convertir les PSC en cellules tumorigènes.

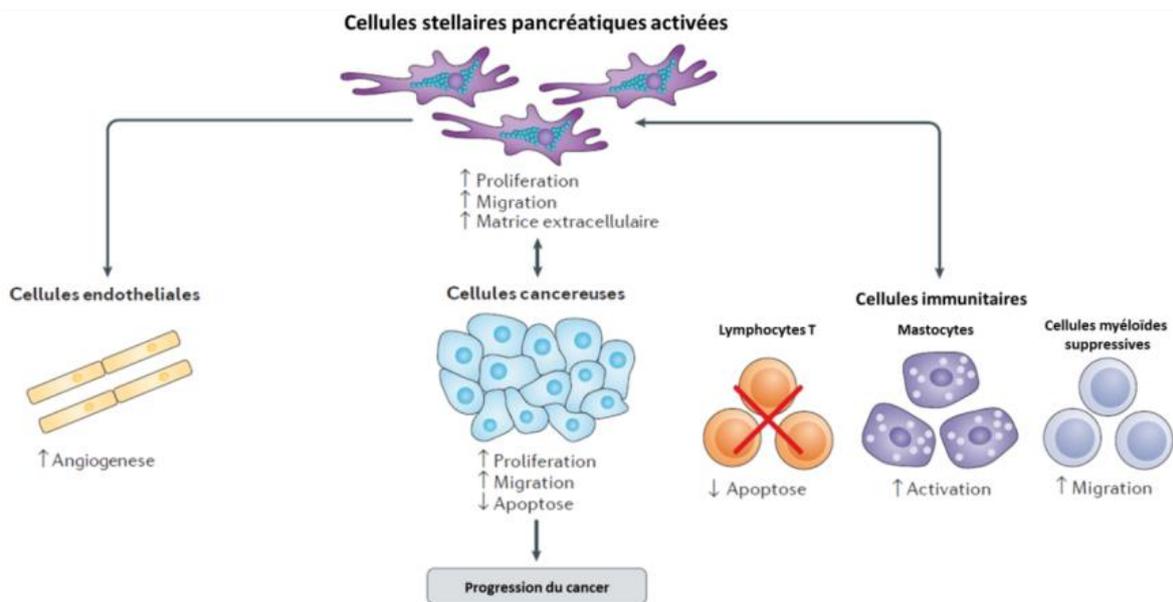


Figure 7. Rôle des CAF dans le PDAC (adapté de Kleef *et al.* 2016 [7])

### 3. Caractéristiques mécaniques

Les propriétés mécaniques du microenvironnement du PDAC sont à prendre en compte dans les recherches sur la croissance tumorale et le développement des thérapies. Comme expliqué précédemment, le PDAC est généralement diagnostiqué à des stades avancés où les tumeurs ont déjà développé une desmoplasie dense, et où l'abondant stroma fibrotique produit par les CAF constitue un « scaffold » mécanique et une barrière physique contre l'apport efficace d'agents thérapeutiques [72], [93]. Bien que le stroma fibrotique dense puisse agir comme une barrière pour la diffusion des agents médicamenteux, il a été montré chez la souris que la délétion ou la suppression des cellules stromales dans les tumeurs accélère la progression du cancer [92], [94], [95]. La desmoplasie et la rigidité du microenvironnement tumoral qui caractérisent de nombreux types de tumeurs, en particulier les cancers du sein et du pancréas, favorisent aussi la progression tumorale et la chimiorésistance [96]–[99].

### a. Mécanobiologie

Le développement du PDAC est un processus multiple et complexe initié par des altérations génétiques et médié par des indices biochimiques et biophysiques du microenvironnement tissulaire. Le rôle des composantes cellulaire et tissulaire en tant que régulateur clé du comportement tumoral a été mis en évidence et souligne l'importance du microenvironnement mécanique en tant que modificateur du phénotype malin [100]. Plus précisément, si le potentiel malin est déterminé par le profil génétique intrinsèque des cellules, le phénotype tumoral est régulé par un équilibre évolutif entre les propriétés physiques et biochimiques des cellules et de la MEC, qui modifie de manière synergique le comportement cellulaire en engageant la contractilité de l'actomyosine et en stimulant l'invasion, la survie et la prolifération.

L'activation des PSC entraîne un dépôt accru de MEC, en particulier de collagène résistant à la traction et d'acide hyaluronique (HA qui est un GAG) résistant à la compression [101], [102]. Le microenvironnement fibrotique ainsi que la pression mécanique exercée par le nombre de cellules stromales et cancéreuses proliférantes facilitent une mécano-pathologie nommée stress solide induit par la croissance tumorale. Ce stress solide entraîne la compression ou l'éclatement des vaisseaux sanguins et lymphatiques intratumoraux conduisant respectivement à une forte hypoxie et une pression élevée du liquide interstitiel (PLI). L'hypoxie et la PLI diminuent la chimiosensibilité *via* des voies distinctes. Le premier favorise la TEM dans les cellules tumorales, et le second altère la perfusion intratumorale des thérapies [103].

Des études sur des modèles animaux ont montré une augmentation de la survie lors de l'utilisation d'une combinaison de PEGPH20 et de gemcitabine par rapport à la gemcitabine seule en raison d'une normalisation de la PLI, d'une réduction des collapsus vasculaires et d'une perméabilité accrue. Cela démontre l'importance du HA dans l'administration des drogues car il peut agir comme un bouclier empêchant l'administration de la chimiothérapie aux cellules tumorales [103].

Le HA favorise la mobilité et la résistance aux médicaments des cellules tumorales par l'expression de la motilité médiée par l'hyaluronane et l'interaction avec CD44. Ce dernier est un marqueur de cellules souches connu qui favorise la métastase par la perte de E-Cadhérine et l'accumulation de  $\beta$ -caténine. Il induit également l'expression du facteur de transcription NANOG et des régulateurs des cellules souches, ce qui

conduit à l'activation de la protéine de résistance aux drogues 1 et à la chimiorésistance à la gemcitabine des cellules CD44 positives [104].

Des modèles 3D basés sur des hydrogels composés de gélatine et de HA de rigidité différentes, 1 kPa à 3 kPa, ont été développés. Ils ont ensuite été utilisés pour imiter la rigidité des tissus pancréatiques sains et malades. Les hydrogels peu rigides ont inhibé la prolifération des cellules PDAC. En revanche, les hydrogels rigides ont favorisé la propagation et la migration des cellules, ce qui a été attribué aux changements induits par la TEM [105]. Ces résultats impliquent une relation synergique entre le HA et la raideur dans la promotion d'un comportement cellulaire malin.

Le ciblage du HA stromal normalise la PLI tumorale, dilate la micro-vasculature et améliore l'administration de chimiothérapie dans les modèles murins de PDAC [93]. Cette réaction peut à son tour altérer la transmission des forces et déplacer l'homéostasie mécanique des cellules tumorales et stromales résidentes en activant leur mécanisme de mécano-sensibilité. Les forces sont détectées et traduites en signaux biochimiques par des éléments moléculaires porteurs de force à la surface des cellules, notamment *via* des complexes d'adhésion induits par les intégrines. Alors que les intégrines n'ont pas d'activité enzymatique intrinsèque, le regroupement des intégrines induit par la pression mécanique peut déclencher des voies de signalisation *via* la « focal adhesion kinase » (FAK), démontrant leur capacité à influencer la signalisation mécano-chimique [106]. Une étude a démontré qu'une activité élevée des FAK dans les tissus humains de PDAC est corrélée à des niveaux élevés de fibrose et de microenvironnement tumoral immunosuppresseur *via* une infiltration réduite des lymphocytes T cytotoxiques [107]. L'inhibition des FAK induit une diminution de la fibrose et de la raideur tissulaire, une réduction de la croissance tumorale et des métastases, et une diminution du nombre de cellules immunosuppressives infiltrant les tumeurs, y compris les cellules myéloïdes suppressives, les MAT et les lymphocytes T régulateurs.

La mécanotransduction fonctionne comme un facteur promoteur de la tumorigenèse. Lier la mécanique tumorale et l'agressivité dans le contexte de génotypes tumoraux spécifiques pourrait également fournir une explication raisonnable aux résultats contradictoires précédemment rapportés avec les thérapies anti-stromales axées sur

l'inhibition de la voie Hh [92], ou la déplétion de l' $\alpha$ -SMA des cellules stromales dans les modèles murins de PDAC [95].

La réticulation du collagène augmente la rigidité des tissus et favorise le cancer du sein invasif *in vitro* et *in vivo* [100]. Le collagène dans le PDAC présente des différences architecturales et structurelles en termes de linéarisation, d'alignement et d'épaisseur, qui peuvent servir de facteur pronostique indépendant, mais pourrait également faciliter l'invasion du cancer [108]. Pourtant, le collagène de type I est considéré comme une barrière structurelle contre l'invasion tumorale, mais paradoxalement, une expression accrue du collagène est associée à une incidence élevée de métastases [109].

Une meilleure compréhension de la mécanique des tissus tumoraux du PDAC pourrait donc améliorer les modèles 3D *in vitro* de tumeurs et permettre le développement de nouvelles thérapies.

## b. Les propriétés mécaniques solides

### Au niveau cellulaire

Une étude sur la rigidité des cellules pancréatiques dans un état adhérent a été réalisée par Nguyen *et al.* [110], les valeurs du module d'Young ont été mesurées au niveau de la région cytoplasmique centrale en utilisant la microscopie à force atomique (Tableau 1) :

Tableau 1 : Propriétés mécaniques solides de différents types de cellules pancréatiques [110]

Nom de la lignée	Type de tumeur pancréatique	Module d'Young (kPa)	Potentiel invasif (%)	
			Blessure	Migration
MiaPaCa-2	Tumeur primaire	1,7 ± 1,0	33 ± 1	5 ± 3
PANC-1	Tumeur primaire	2,4 ± 1,1	40 ± 2	11 ± 5
Hs766T	Tumeur dérivée d'un épanchement pleural métastatique	3,0 ± 2,0	60 ± 5	62 ± 5
HPDE	Cellule épithéliale pancréatique canalaire normale	3,7 ± 1,2	22 ± 4	-

Ces résultats montrent que plus les cellules tumorales sont rigides plus elles sont invasives. En effet, les cellules Hs766T (métastase) ont un potentiel invasif significativement plus élevé que les PANC-1 et les MiaPaCa-2 (tumeur primaire) [110]. On peut noter que les cellules pancréatiques normales (HPDE) sont plus rigides que les cellules tumorales.

L'évolution de la rigidité des cellules aux cours de la progression du cancer est complexe. Il semblerait que la rigidité des cellules diminue afin de favoriser la mobilité cellulaire, et donc l'invasion, puis réaugmente lors de la formation de métastases pour favoriser l'implantation dans le nouveau site tumoral. Plus une cellule cancéreuse est rigide, plus son potentiel métastatique est élevé. Ce processus est visible dans le mélanome [111] et le cancer du sein [112].

### **Au niveau tissulaire**

L'augmentation de la densité des cellules cancéreuses, des cellules stromales et des constituants de la MEC dans le microenvironnement du tissu hôte, conduit au développement d'un stress mécanique au sein de la tumeur [113]–[115]. Ce stress, est connu sous le nom de stress solide et peut être divisé en deux parties (Figure 8). Le **stress induit par la croissance** qui est accumulé pendant la croissance de la tumeur par des interactions entre les composants structurels du microenvironnement tumoral, et qui reste dans la tumeur même si la tumeur est enlevée [116]. Ces interactions peuvent inclure l'étirement du collagène par les cellules cancéreuses et les CAF, et le gonflement du HA et des cellules cancéreuses pour résister à la compression [115], [117]. La seconde partie est due à la **contrainte de compression réciproque** qui est appliquée du tissu hôte à la tumeur. Cette contrainte permet de résister à l'expansion tumorale à mesure que les tumeurs se développent et exercent des forces sur le tissu hôte adjacent. Ce stress est nommé stress extérieur et diminue après l'excision de la tumeur [99]. La contrainte solide à l'intérieur d'une tumeur est compressive, tandis qu'à l'interface entre la tumeur et le tissu normal, s'applique une contrainte de traction [118], [119].

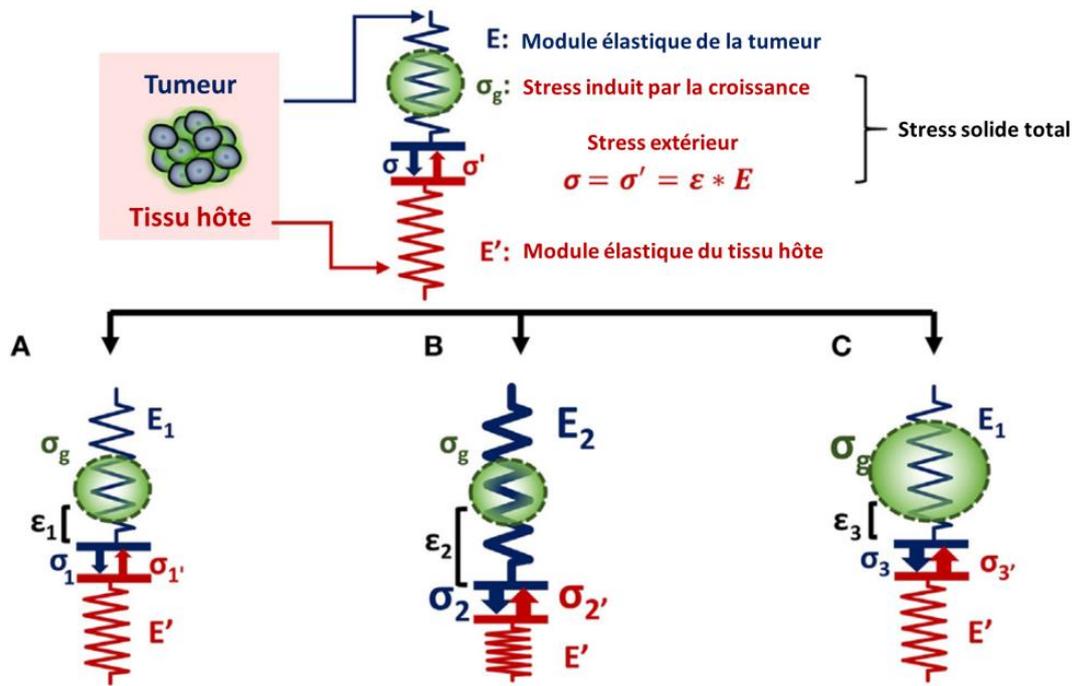


Figure 8. Propriétés mécaniques solides du microenvironnement tissulaire (adapté de Kalli *et al.* 2018 [120])

Dans la littérature, il n'est pas clairement défini si la rigidité et le stress solide se réfèrent au même terme ou s'il s'agit de deux propriétés biomécaniques distinctes d'une tumeur qui sont liées l'une à l'autre. Par définition, la rigidité est une propriété du matériau, qui décrit la mesure dans laquelle un matériau résiste à la déformation en réponse à une force appliquée, tandis que la contrainte solide est une force par unité de surface, qui peut provoquer soit la compression soit l'expansion d'un matériau.

Dans les tumeurs solides, la rigidité est principalement déterminée par la composition et l'organisation de la MEC, tandis que le stress solide résulte de la somme des forces physiques exercées pendant la croissance de la tumeur. Ces forces peuvent être générées au niveau subcellulaire par des filaments du cytosquelette qui contrôlent les processus cellulaires tels que la formation et l'extension des filopodes. Au niveau cellulaire, les forces sont exercées par les contractions cellulaires et les interactions cellule-MEC, tandis qu'au niveau tissulaire, les forces sont exercées entre la tumeur et le tissu hôte [121]–[123].

La relation entre la rigidité tumorale et la contrainte solide peut être décrite en utilisant l'analogie avec un ressort qui suit la loi de Hooke pour les matériaux élastiques linéaires :

$$\sigma = E \times \epsilon$$

Avec  $\sigma$  la contrainte appliquée,  $E$  le module d'Young du matériau et  $\varepsilon = \delta l/l_0$  la déformation (où  $l_0$  est la longueur initiale du matériau et  $\delta l = l - l_0$  sa variation de longueur). Afin de comprendre le lien entre la rigidité et le stress solide, différents cas sont possibles (Figure 8) :

- Cas A : Une tumeur de module élastique  $E_1$  se développe et pousse le tissu hôte environnant de module élastique  $E'$ , elle provoque une déformation  $\varepsilon_1$  et une contrainte  $\sigma_1$ . Par réaction, le tissu hôte renvoie une contrainte égale et opposée  $\sigma_1'$ . Dans le même temps, un stress solide induit par la croissance tumorale est accumulé à l'intérieur de la tumeur. Ainsi, la contrainte solide totale accumulée à l'intérieur de la tumeur est la somme de la contrainte solide appliquée à l'extérieur et induite par la croissance.
- Cas B : Ici la rigidité de la tumeur  $E_2$  est supérieure à  $E_1$  (cas A), alors la tumeur peut déplacer le tissu hôte avec une plus grande déformation ( $\varepsilon_2 > \varepsilon_1$ ) et la contrainte solide  $\sigma_2$  peut être supérieure à  $\sigma_1$ . Par conséquent, la tumeur crée une matrice plus rigide pour pousser le tissu normal et grossir. Le stress solide total accumulé à l'intérieur de la tumeur est supérieur à celui de (A) sans aucune modification du stress induit par la croissance.
- Cas C : Si le stress solide induit par la croissance tumorale augmente alors que la rigidité de la matrice peut rester la même [118], [119]. Dans ce cas, la contrainte solide extérieure  $\sigma_3'$  peut être égale à  $\sigma_1'$ , mais la contrainte solide totale augmente. Par conséquent, le stress résultant transmis à l'intérieur de la tumeur est supérieur à celui du cas A sans aucune modification de la rigidité de la tumeur.

Cette dernière hypothèse a été confirmée par une étude montrant que le stress solide total transmis dans les cellules ne peut dépendre que partiellement de la rigidité tumorale. Il a été constaté que les tumeurs pancréatiques primaires présentaient des contraintes plus importantes que celles des sites métastatiques, tandis que l'effet inverse était observé pour les tumeurs du côlon. Dans le même temps, la rigidité tumorale était similaire dans la tumeur primaire et métastatique pour les modèles de cancer du pancréas et du côlon, montrant que la rigidité tumorale et le stress solide ne sont pas nécessairement couplés l'un à l'autre. L'étude montre également que le stress solide augmente dans les tumeurs du sein de plus grande taille malgré le fait que la rigidité ne change pas avec la taille de la tumeur [118].

Les propriétés mécaniques élastiques (module d'Young) des tumeurs de PDAC ont été caractérisées par Rubiano [124]. Les tumeurs du PDAC (1,89-13,7 kPa) ont un module élastique significativement plus élevé que les tissus normaux ( $1,06 \pm 0,25$  kPa). Les valeurs des modules d'Young pour le PDAC sont similaires au cancer du sein par rapport aux tissus normaux [94].

### c. Mécaniques des fluides et transports

#### Modélisation mathématique

##### *Loi de Darcy*

L'environnement du liquide interstitiel tumoral est considéré comme un milieu poreux. Il est possible de calculer théoriquement les profils de vitesse et de pression en utilisant la loi de Darcy [125]:

$$\vec{u}(\vec{r}) = -K\nabla p$$

Avec  $\vec{u}$  le champ de vitesse de l'écoulement,  $p$  la pression du liquide interstitiel qui représente la force motrice et  $K$  la conductivité hydraulique du tissu qui décrit la capacité de déplacement du liquide interstitiel à travers l'interstitium.

La partie complexe, mais essentielle pour la mesure de la PLI, consiste à déterminer la valeur de  $K$ . Généralement, la conductivité hydraulique dépend de la perméabilité intrinsèque du matériau ( $k$ ), de l'accélération de la pesanteur ( $g$ ), de la masse volumique ( $\rho$ ) et de la viscosité dynamique ( $\mu$ ) du fluide :

$$K = \frac{k\rho g}{\mu}$$

Les composants solides, similaires à un lit poreux, influencent la conductivité hydraulique à travers la fraction du volume de l'espace interstitiel tissulaire, du diamètre et de la densité cellulaire, de l'architecture de la matrice interstitielle et de la PLI [126]–[128]. Une étude récente [129], a rapporté les différentes expressions mathématiques de la conductivité hydraulique :

- Dans un premier cas, l'expression de  $K$  a été proposée [130] en termes de concentration en glycosaminoglycane,  $C_{GAG}$  (g/100 g de tissu) :

$$K = 4,6 \times 10^{-13} (C_{GAG})^{-1,202}$$

- Un deuxième cas propose que, en plus de la concentration de GAG, les fibrilles de collagène (la principale protéine structurelle de la MEC) et leur combinaison

avec des protéoglycanes contribuent de manière significative à la résistance du transport interstitiel. Ainsi, l'expression de  $K$  prenant en compte la concentration de collagène  $C_c$  devient [126] :

$$K = 1,91 \times 10^{-14} \left( \frac{C_{GAG}}{1 - C_c v_c} \right)^{-1,485} (1 - C_c v_c) \zeta$$

Où  $v_c$  est le volume spécifique effectif d'une fibrille de collagène (1,89 cm<sup>3</sup>/g) et  $\zeta$  un facteur de tortuosité.

- Enfin un troisième cas où, en plus de  $C_{GAG}$  et  $C_c$ , la teneur en eau tissulaire  $z$  est à prendre en compte [131] :

$$K = az^b$$

Ici  $a$  et  $b$  sont des constantes liées aux conditions interstitielles. La conductivité hydraulique augmente avec la teneur en eau mais les suggestions sur la teneur en eau des tissus tumoraux sont variables. En effet, certains travaux ont indiqué que la teneur en eau des tissus tumoraux est inférieure à celle du tissu sain environnant [132], tandis que d'autres ont suggéré l'inverse [133], [134]. Dans les deux cas, la teneur en eau du tissu peut changer en raison de la PLI et varie au sein de la tumeur. Ceci implique que la conductivité hydraulique varie également.

Dans la majorité des études, la conductivité hydraulique au sein d'une tumeur est considérée comme constante et sa valeur par rapport à celle des tissus sains environnants diffère selon les travaux :

- Supérieure [125], [130], [135]
- Egale [136], [137]
- Inférieure [138]. Jain et Baxter ont indiqué que « *la réduction de la densité cellulaire tumorale peut entraîner une augmentation de la conductivité hydraulique des tissus et donc une baisse de la PLI* » [139]

Ces différences sont dues au fait que la conductivité hydraulique n'est pas constante dans la plupart des tissus tumoraux. Il s'agit d'une variable spatialement dépendante. Elle est en fait dépendante de la distribution de la PLI dans la tumeur et celle-ci évolue spatialement dans la tumeur. Des résultats expérimentaux ont montré que la conductivité hydraulique varie avec la PLI et donc varie spatialement [127], [140], [141]. La conductivité hydraulique tissulaire fluctue également avec l'hydratation et le

gradient de pression [126], elle diminue exponentiellement avec la contrainte/déformation et l'hydratation des tissus [135], [142].

Grâce à ces différents modèles mathématiques, Liu *et al.* ont pu modéliser les variations de pressions dans les tissus tumoraux à partir des vitesses du liquide interstitiel. Ils ont obtenu des pressions allant jusqu'à 40 mmHg<sup>7</sup> au centre de la tumeur [129].

### **Equation de Brinkman**

Le modèle de Darcy suppose que toutes les contraintes dans l'écoulement sont négligeables par rapport aux contraintes à l'interface solide/liquide du milieu poreux. Il est nécessaire de prendre en compte les contraintes visqueuses dans le domaine liquide. L'écoulement du liquide interstitiel se fait à travers un milieu considéré poreux et son nombre de Reynolds<sup>8</sup> étant faible, les effets d'inertie peuvent être négligés par rapport aux forces visqueuses. L'écoulement suit alors les équations de Brinkman et de continuité [143] :

$$\nabla p = \mu \Delta \vec{u} - \frac{\mu}{k_p} \vec{u}$$

$$\nabla \cdot \vec{u} = 0$$

Avec  $\vec{u}$  le champ de vitesse de l'écoulement,  $p$  la pression interstitielle,  $\mu$  la viscosité dynamique du fluide interstitiel et  $k_p$  la perméabilité de Darcy de la matrice poreuse de collagène. Dans l'équation de Brinkman, le terme de gauche est le gradient de pression. Le premier terme de droite représente le terme visqueux, et le deuxième terme représente le terme de Darcy-Forchheimer, qui caractérise l'écoulement dans un milieu poreux.

Il est possible de réécrire ces équations en fonction de grandeurs adimensionnelles définies de la manière suivante :  $\vec{u}^* = \vec{u}/U$ ,  $p^* = p/\rho U^2$ ,  $\vec{x}^* = \vec{x}/D$  et  $\vec{k} = \vec{k}_p/D^2$ . Avec  $U$  la vitesse caractéristique de l'écoulement,  $D$  le diamètre de l'interstitium,  $\rho$  la masse volumique du liquide et  $\vec{x}$  le vecteur position. On obtient alors les équations adimensionnées suivantes :

---

<sup>7</sup> 1 mmHg = 133,322 Pa

<sup>8</sup> Le nombre de Reynolds représente le rapport entre les forces d'inertie et les forces visqueuses

$$\nabla p^* = \frac{1}{Re} \Delta \vec{u}^* - \frac{1}{Re \times k} \vec{u}^*$$

$$\nabla \cdot \vec{u}^* = \vec{0}$$

Avec  $Re = \rho UD / \mu$ , le nombre de Reynolds. Le terme visqueux est ici négligeable devant le terme de Darcy-Forchheimer car  $k$  est très petit ( $k \sim 10^{-6}$ ). Finalement, on obtient une forme approchée de l'équation de Darcy prenant en compte les forces visqueuses :

$$\nabla p^* = -\vec{u}^* / (Re \times k)$$

$$\vec{u}^* = -(Re \times k) \nabla p^*$$

Dans leur étude, Yao *et al.* [143] ont pris en compte l'effet des capillaires sanguins, des fibrilles de collagène et des mastocytes sur l'écoulement du liquide interstitiel. Ils ont obtenu des vitesses de l'ordre de quelques  $\mu\text{m/s}$  (de 0,75 à 1,5). Il est important pour la suite (Chapitre 2 : simulation numérique) de noter que dans le modèle décrit la perméabilité de Darcy vaut :  $k_p = 10^{-16} \text{m}^2$ .

### ***Rhéologie du liquide interstitiel***

Le liquide interstitiel est considéré comme un fluide newtonien (Figure 9). C'est-à-dire que sa viscosité est constante en fonction de la contrainte de cisaillement appliquée. La relation entre la contrainte et le taux de cisaillement est linéaire et s'écrit de la manière suivante :

$$\tau = \mu \dot{\gamma}$$

Avec  $\tau$  la contrainte de cisaillement,  $\mu$  la viscosité dynamique et  $\dot{\gamma}$  le taux de cisaillement qui est la dérivée temporelle du taux de déformation  $\dot{\gamma} = dx/dy$ . On a donc :

$$\dot{\gamma} = \frac{d}{dt} \frac{dx}{dy} = \frac{d}{dy} \frac{dx}{dt} = \frac{du}{dy}$$

Avec  $u = \frac{dx}{dt}$ . C'est pourquoi le taux de cisaillement est aussi appelé le gradient de vitesse.

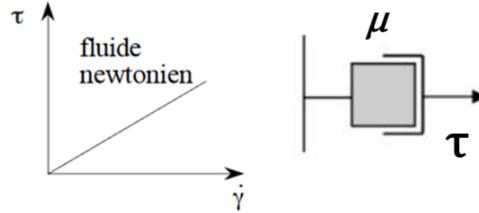


Figure 9. Modèle rhéologique newtonien et sa modélisation (amortisseur)

Cette relation est valable pour la phase fluide du liquide interstitiel. Il a été démontré que le liquide interstitiel possédait une phase viscoélastique gel-fluide [144]. Le comportement des fluides viscoélastiques linéaires est modélisé par deux éléments en série qui constituent le modèle de Maxwell : un ressort suivant la loi de Hooke (voir précédemment) et un amortisseur newtonien (Figure 10).

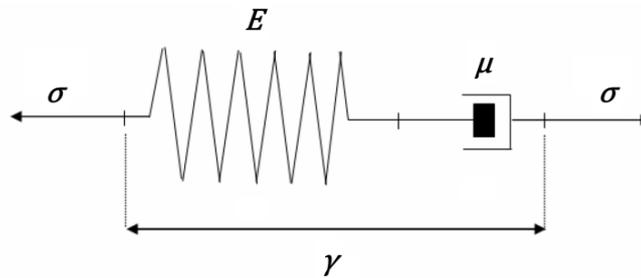


Figure 10. Modèle de Maxwell constitué d'un ressort et d'un amortisseur

L'équation de Maxwell associée au modèle est la somme des déformations des deux modèles en série ( $\gamma_{tot} = \gamma_{amortisseur} + \gamma_{ressort}$ ). La contrainte totale est homogène dans les deux éléments ( $\sigma_{tot} = \sigma_{amortisseur} = \sigma_{ressort}$ ) avec  $\sigma_{amortisseur} = \mu\dot{\gamma}$  et  $\sigma_{ressort} = E\gamma$ . Ainsi l'équation de Maxwell s'écrit :

$$\lambda\dot{\sigma} + \sigma = \mu\dot{\gamma}$$

Avec  $\lambda = \mu/E$  le temps de relaxation de Maxwell. La solution générale de cette équation est :

$$\sigma(t) = \int_{-\infty}^t E e^{-(t-t')/\lambda} \dot{\gamma}(t') dt'$$

Pour le modèle de Maxwell, le module de relaxation  $G(t)$  s'écrit :  $G(t) = E e^{-t/\lambda}$ , on peut donc réécrire la solution générale :

$$\sigma(t) = \int_{-\infty}^t G(t-t') \dot{\gamma}(t') dt'$$

Expérimentalement, afin de déterminer les propriétés viscoélastiques comme le temps de relaxation, on applique une déformation périodique sinusoïdale :  $\gamma = \gamma_0 \sin(\omega t)$  avec  $\gamma_0 \ll 1$ , ce qui permet de mesurer la contrainte résultante qui est elle aussi sinusoïdale avec un déphasage par rapport à la déformation :  $\sigma = \sigma_0 \sin(\omega t + \phi)$ . Ici  $\omega$  est la pulsation et  $\phi$  est la phase. La contrainte et la déformation sont liées par le module de cisaillement complexe  $G^*$ , pour le modèle de Maxwell il s'écrit :

$$\sigma(t) = G^*(\omega)\gamma(t) \text{ et } G^*(\omega) = G'(\omega) + iG''(\omega)$$

Avec la partie réelle :  $G'(\omega) = \frac{E\lambda^2\omega^2}{1+\lambda^2\omega^2}$  qui correspond au module élastique (module de conservation ou de stockage) et la partie imaginaire :  $G''(\omega) = \frac{E\lambda\omega}{1+\lambda^2\omega^2}$  qui correspond à la partie visqueuse (module de perte par déformation visqueuse).

Enfin, la relation entre  $G^*$  et  $G(t)$  est :  $G^*(\omega) = i\omega \int_0^{+\infty} G(t)e^{-i\omega t} dt$

Il est également possible de définir la viscosité complexe  $\mu^*$  de la manière suivante :

$$\sigma(t) = \mu^*(\omega)\dot{\gamma}$$

Avec :

$$\mu^* = \frac{G''}{\omega} + i\frac{G'}{\omega}$$

## Mesures expérimentales

L'acheminement du liquide interstitiel, qui transporte les nutriments et les molécules de signalisation, dans les tissus est régi par des principes physiques de transport de molécules (en soluté) et de flux liquides [125]. Le flux de soluté est entraîné par la diffusion, qui dépend des gradients de concentration, et la convection, qui est déterminée par un gradient de pression hydrostatique favorisant l'efflux de fluide des vaisseaux en opposition à un gradient de pression oncotique favorisant la rétention de fluide. Ces gradients de pression oncotique et hydrostatique à travers les tissus entraînent un écoulement de fluide à travers la MEC [145]. Cet écoulement est appelé écoulement interstitiel et est reconnu comme un facteur essentiel de la physiologie tissulaire et du transport de molécules [125]. Des études sur l'écoulement dans l'interstitium tissulaire ont déterminé que les vitesses d'écoulements typiques étaient de l'ordre de 0,1 à 2,0  $\mu\text{m/s}$  mais pouvait atteindre des vitesses allant jusqu'à 4,0  $\mu\text{m/s}$  dans certains cas [146], [147].

Les très faibles PLI qui facilitent l'efflux de liquide dans les organes sains peuvent considérablement augmenter au cours des néoplasies conduisant à des gradients de pression interstitielle élevés dans la tumeur [148]. L'écoulement interstitiel est maintenant connu comme stimulus pour guider la migration des cellules tumorales dans la formation de métastase [149]–[151]. De plus, les PLI excessivement élevées peuvent entraver les thérapies administrées par voie systémique et compromettre le traitement des tumeurs solides [93]. L'augmentation de la PLI dans les tumeurs solides a été étudiée dans différents modèles et varie généralement de 10 à 60 mmHg [144], [152], ce qui est comparable aux pressions hydrostatiques dans les capillaires terminaux. Par conséquent, cette PLI élevée représente une barrière relative à l'administration de médicaments dans les tumeurs solides [153], [154]. Cela est particulièrement vrai pour le PDAC, caractérisé par une réponse fibro-inflammatoire robuste, un effondrement vasculaire généralisé [93] et une hypoperfusion [72], qui ensemble, servent de principaux mécanismes de chimiorésistance.

Le liquide interstitiel se compose de deux phases : une faible phase fluide (non liée et librement mobile) et une phase viscoélastique gel-fluide dominante [155]. La majorité du liquide interstitiel tissulaire réside dans la phase gel-fluide composée principalement de HA. Celui-ci possède une capacité à s'imprégner et à complexer de grandes quantités d'eau [156], [157]. Le HA établit donc une phase gel-fluide importante et moins mobile dans les interstices tissulaires.

Dans les tumeurs pancréatiques, du fait de cette phase viscoélastique dominante et de la teneur en HA particulièrement élevée (jusqu'à 420 ng/mg), les pressions excessives associées pouvant atteindre 100 mmHg [144], provoquent un effondrement vasculaire et une hypoperfusion, altérant ainsi profondément la physiologie intratumorale. Ce phénomène contribue grandement à la résistance thérapeutique. La viscosité dynamique des tumeurs pancréatiques a été mesurée autour de  $349 \pm 222$  kPa.s, ce qui est légèrement plus élevé que celle des tissus sains ( $252 \pm 134$  kPa.s) [124]. La dégradation enzymatique de HA peut libérer le fluide lié et réduire considérablement la viscosité et les pressions du fluide à des niveaux associés au fluide libre résiduel, permettant ainsi une revascularisation du tissu. Ceci permet donc une meilleure administration des thérapies au sein de la tumeur.

## IV. Les modèles d'études *in vitro* microfluidiques

### 1. Généralités

Les faibles progrès dans le traitement du PDAC et la nécessité d'une meilleure compréhension de la maladie poussent les chercheurs à se tourner vers de nouvelles approches, au développement et à la caractérisation de nouveaux modèles d'études. Jusqu'à présent, des techniques conventionnelles de cultures cellulaires bi- (2D) ou tridimensionnelles (3D) et des modèles animaux ont été utilisés pour étudier le PDAC. Cependant, la culture 2D est connue pour ne pas reproduire intégralement la biologie tumorale en raison d'un manque de pertinence physiologique notamment au niveau des interactions cellule-cellule et cellule-MEC [158]. Les modèles 2D (Figure 11) ne reproduisent pas l'organisation structurale ou les caractéristiques physiopathologiques des carcinomes *in vivo* [159], [160]. Les modèles de culture 3D (Figure 11), plus récents, sont plus pertinents du point de vue physiologique, les sphéroïdes tumoraux ou tumoroïdes modélisent l'organisation cellulaire 3D visible *in vivo* en incluant les cellules dans une matrice 3D telle que le collagène et le Matrigel™. Ces modèles sont devenus des outils importants dans la recherche sur le cancer et la découverte de nouvelles thérapies [161]. Toutefois, la dimension statique de ces modèles ne permet pas d'être pertinent dans la modélisation de la physique du microenvironnement [162]. Enfin, les modèles animaux (Figure 11), qui eux se rapprochent de la situation *in vivo*, sont eux coûteux, gourmands en temps et en main d'œuvre et sont soumis à des limitations éthiques et biologiques [163], [164].

Avec les limites des modèles 2D et 3D *in vitro* actuels, les organes sur puces suscitent donc un intérêt grandissant dans le monde de la recherche médicale permettant d'acquérir de nouvelles connaissances sur les processus fondamentaux impliqués dans la biologie du cancer et le ciblage thérapeutique [165], [166]. Apparus au début des années 2000, les systèmes microfluidiques ont gagné en popularité dans la recherche sur le cancer et tendent à reproduire le plus fidèlement possible des aspects clés de la physiologie et du microenvironnement des tissus humains, grâce au contrôle spatial de l'architecture tissulaire, à la reproduction de fonctions complexes au niveau des organes et à l'ajout d'un contrôle des flux. Le contrôle de ces paramètres physiques permet aussi de reproduire des signaux mécaniques spécifiques à un organe par l'application de forces (compression et/ou étirement). Il a été démontré que les systèmes microfluidiques permettent la modélisation des caractéristiques de base

des cancers, comprenant la croissance tumorale, la progression du stade précoce au stade avancé, l'invasion, l'angiogenèse, la TEM et les métastases [167].

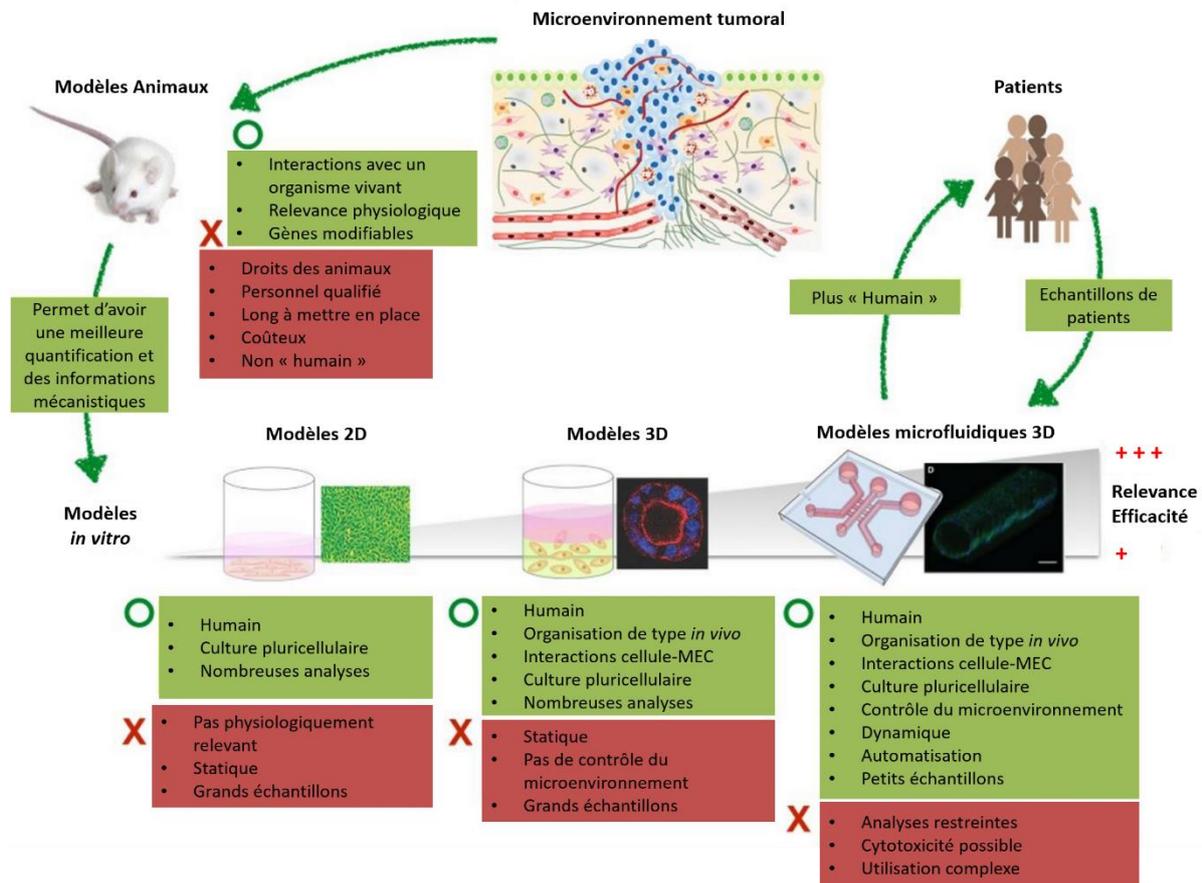


Figure 11. Comparaison des modèles d'études existant (adapté de Sung *et al.* [168])

Les systèmes microfluidiques sont principalement fabriqués en plastique, en verre ou en polydiméthylsiloxane (PDMS). Ils possèdent des microcanaux permettant une configuration contrôlée de la MEC, incluant un ou plusieurs type(s) cellulaire(s), et des flux, par la génération de gradients de milieu de culture (nutriments, O<sub>2</sub>), comprenant ou non des agents thérapeutiques [169]. Des études sur le cancer du poumon ont permis de démontrer l'impact d'un contrôle précis des gradients chimiques en utilisant les organes sur puces. Dans ces études, un système microfluidique a été utilisé permettant de générer des gradients d'oxygène afin de tester la sensibilité des cellules cancéreuses épithéliales alvéolaires du poumon à la tirapazamine. Les résultats ont montré une efficacité accrue du médicament sous un faible gradient d'oxygène [170]. Dans une autre étude, un système microfluidique contenant des chambres de culture 3Densemencées de cellules cancéreuses du poumon connectées à une autre

chambre contenant des CAF a été utilisé. La chambre comprenant les CAF est connectée à un générateur de gradient de concentration linéaire. Les résultats ont montré que la sécrétion de HGF par les CAF pouvait inhiber la mort induite des cellules cancéreuses du poumon par le paclitaxel [171].

Afin de mettre en évidence l'apport d'un microenvironnement de type *in vivo* et son impact sur les thérapies, une étude de co-culture 3D en système microfluidique, incluant des lignées cellulaires d'adénocarcinome pulmonaire humain et des HUVECs (cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine) intégrées dans une matrice de collagène, a montré que les conditions de culture avaient des effets sur les thérapies ciblant des voies de la TEM. L'expression des marqueurs TEM a fortement chuté lorsque les cellules tumorales ont été cultivées seules alors que les effets dans la co-culture avec les HUVECs étaient moindres [172].

Un autre apport des systèmes microfluidiques est son application à la thérapie personnalisée. Une étude sur le cancer du poumon à l'aide de dispositifs microfluidiques, soumis à différentes concentrations d'agents chimiothérapeutiques, a montré que la sensibilité aux différents agents, unique ou en association, a pu être déterminée en parallèle et être optimisée chez les patients [173].

La diversité des systèmes d'organes sur puces permet une application des modèles à une grande variété de tissus, tels que le système vasculaire [174], [175], les reins [176], les intestins [177], le pancréas exocrine [178]–[180] ou endocrine [181] et bien d'autres encore.

## **2. L'apport de la microfluidique pour l'étude du PDAC**

Les dispositifs microfluidiques gagnent en importance pour l'étude du PDAC. La structure à microcanaux dans les dispositifs microfluidiques est optimale pour la culture de proximité de cellules cancéreuses avec des cellules stromales et convient également pour l'encapsulation d'agrégats tumoraux dans la MEC. Par conséquent, les cultures de cellules 3D dans des dispositifs microfluidiques peuvent permettre l'étude *in vitro* des interactions entre les composants du microenvironnement tumoral dans des conditions physiologiquement pertinentes [182], [183]. Malgré l'intérêt croissant pour ces modèles d'études, la littérature reste encore limitée concernant le PDAC.

Parmi les études sur le PDAC, l'équipe de Meike Beer [178] a démontré l'apport des puces microfluidiques pour l'étude du PDAC. Ces systèmes peuvent être appliqués à des cellules PDAC en culture, tout en maintenant leur viabilité, leur aspect morphologique et leurs caractéristiques de croissance. Ce système microfluidique inclut des cellules tumorales pancréatiques (BxPC-3, PANC-1 et MiaPaCa-2) dans une matrice de collagène soumise à un flux constant de 3,123  $\mu\text{l}/\text{min}$ . Cette étude a permis de montrer une chimiorésistance accrue des cellules PDAC vis-à-vis du cisplatine par rapport aux cultures 2D et 3D. Par exemple, l' $\text{IC}_{50}$  des PANC-1 est égale à 3  $\mu\text{M}$  en 2D, 15  $\mu\text{M}$  en 3D et 100  $\mu\text{M}$  dans le système microfluidique, ce qui est significativement plus grand. Pour rendre ce modèle encore plus pertinent, une co-culture avec des PSC serait intéressante.

Afin d'observer le remodelage de la MEC et déterminer la réponse des cellules à la chimiothérapie à base de paclitaxel, l'équipe de Drifka *et al.* [184] a développé un système de co-culture en gouttelettes contenant du collagène de type I (2 à 4 mg/ml) et du HA (2 mg/ml) mélangés avec des cellules de PDAC (PANC-1), des fibroblastes ou des PSC (ratio 1:4 à 1:8). L'analyse de viabilité suite à un traitement par le paclitaxel a démontré une chimiorésistance accrue des co-cultures 3D en gouttes par rapport aux cultures 2D. L' $\text{IC}_{50}$  des PSC et PANC-1 est égale respectivement à 0,197 nM et 0,050 nM en 2D, et plus de 100 nM en co-culture dans le système microfluidique, ce qui est significativement plus grand. Il est à noter que c'est la seule étude incluant du HA dans la MEC.

Dans une autre étude [185] de la même équipe utilisant un dispositif à microcanaux, des cellules PANC-1 ont été co-cultivées avec des PSC (ratio 1:1) sous forme de sphéroïdes multicellulaires dans une matrice de collagène de type I (2 mg/ml). Les co-cultures 3D ont favorisé l'alignement des fibres de collagène et amélioré la migration des deux types de cellules. Ces résultats suggèrent que les PSC aident les cellules tumorales dans leur navigation à l'extérieur de la tumeur et que l'organisation spécifique du collagène stromal est tout aussi, sinon plus, importante que la quantité de collagène dans la modulation de la progression tumorale. Cette étude permet une compréhension élargie de la façon dont les PSC modulent les interactions tumeur-stroma au cours de la progression du PDAC et montre que les PSC sont des cibles potentielles pour les stratégies anti-migratoires [108], [185].

L'équipe de Lee a publié en 2018 [179] un travail sur un système de co-culture microfluidique, dans lequel des sphéroïdes de tumeurs pancréatiques (PANC-1) ont été co-cultivés avec des PSC (ratio 1:2) dans une matrice de collagène de type I (2 mg/ml) pour étudier la distance à laquelle les cellules tumorales déclenchent leur activation. Chaque type de cellule a été placé dans un canal différent séparé par une membrane poreuse en PDMS, permettant la migration des cellules tumorales vers le canalensemencé de PSC à travers la membrane poreuse. L'activation des PSC s'est produite à une distance de 1 mm des cellules tumorales *via* des facteurs sécrétés. Ils ont aussi montré que l'expression des marqueurs liés à la TEM, tels que la vimentine et le TGF- $\beta$ , était plus élevée dans les sphéroïdes co-cultivés que dans les sphéroïdes mono-cultivés [179].

Plus récemment, un système permettant de créer un mouvement de cisaillement rotatoire et ainsi mimer l'hémodynamique physiologique appliquée par les cellules endothéliales dans le microenvironnement tumoral, a été développé. Les cellules endothéliales ont été séparées par une membrane poreuse de polycarbonate de la co-culture 3D de cellules PDAC et de PSC dérivés de patients. L'analyse du transcriptome a révélé que les co-cultures 3D microfluidiques étaient similaires au transcriptome du patient [186].

La société MIMETAS a développé un système microfluidique multicanaux sur plaque (OrganoPlate) permettant de modéliser un flux interstitiel [180]. Le dispositif est composé de 3 canaux, un canal central permettant la culture de cellules tumorales dans du collagène I et deux canaux latéraux qui permettent de générer le flux interstitiel par différence de pression entre le canal supérieur et le canal inférieur. Le premier résultat montre que la prolifération des cellules tumorales est réduite de plus de 30% sous contrainte du flux (2  $\mu$ m/s). Ensuite, l'analyse de viabilité après un traitement à la gemcitabine a démontré une chimiorésistance accrue des co-cultures 3D par rapport aux cultures 3D et 2D. Par exemple, l'IC<sub>50</sub> des cellules tumorales pancréatiques S2-028 est égale à 31 nM en 2D, 85 nM en 3D et 277 nM dans le système microfluidique, ce qui est significativement plus grand. Ceci est dû à une activité plus élevée des protéines de résistance aux drogues (de la famille des MRP) transportant la gemcitabine en dehors des cellules sous la contrainte d'un flux interstitiel [180].

Dans l'étude de Nguyen *et al.* parue en 2019 [187], les auteurs ont utilisé un modèle organotypique 3D composé de deux canaux cylindriques creux, complètement

intégrés dans la matrice de collagène I (2,5 mg/ml), pour démontrer que les interactions tumeur-cellules endothéliales ne sont pas seulement limitées à l'intravasation, à l'extravasation et au mimétisme vasculaire, mais incluent également le processus d'ablation endothéliale dans les vaisseaux sanguins. Leur modèle de PDAC et de vaisseaux sanguins a fourni une complexité suffisante pour révéler ce processus, et leur a permis d'introduire un contrôle génétique et spatio-temporel pour isoler les voies de signalisation impliquées pour chaque type de cellule [187].

Enfin, une équipe américaine a développé un système microfluidique pour imiter la TEM et l'invasion locale [188]. Ce modèle présente une hétérogénéité intratumorale où l'épithélium des cellules cancéreuses pancréatiques canalaire est entouré par la matrice de collagène I (6 mg/ml), qui récapitule le microenvironnement du PDAC. Ce modèle microfluidique a été créé à l'aide de cellules cancéreuses pancréatiques murines isolées à partir de tissus PDAC de deux génotypes différents de souris génétiquement modifiées. Il s'agit du génotype KPC avec mutations *KRAS* et *TP53*, et de deux génotypes KIC avec mutations *KRAS* et *CDKN2A*. Les génotypes KIC présentent deux phénotypes distincts, l'un épithélial et l'autre mésenchymateux. La prolifération et l'invasion locale ont été caractérisées et comparées à l'aide de ce modèle. L'hétérogénéité intratumorale a également été imitée par la co-culture de ces lignées KPC et KIC. Par cela, ils ont pu démontrer la faisabilité de la construction d'un modèle avec une hétérogénéité intratumorale contrôlée et ont montré qu'il existe des interactions complexes, même entre les cellules cancéreuses et que les interactions rendent les cellules cancéreuses plus agressives et invasives [188].

L'ensemble de ces travaux montre l'intérêt de la co-culture 3D et microfluidique dans l'étude du PDAC notamment sur la chimiorésistance quel que soit le traitement utilisé (cisplatine, paclitaxel et gemcitabine). Une de ces études a même démontré par une analyse du transcriptome que les résultats étaient identiques à ceux obtenus chez un patient atteint de PDAC. Ce qui confirme la pertinence de ces modèles. La majorité des MEC utilisées est à base de collagène I et une étude y a introduit du HA. Il est à noter qu'aucune étude sur le protocole FOLFIRINOX n'a encore été publiée à l'heure actuelle mais qu'un projet de la clinique Mayo de Rochester (USA) est en cours.

## **Objectifs du travail**

Dans ce contexte, nos objectifs ont été :

1. Construire un dispositif de culture 3D microfluidique permettant de reproduire le microenvironnement tumoral sur les plans biologique et mécanique, ainsi que de modéliser les écoulements et transports de masse présents dans une tumeur pancréatique.
2. Etudier les interactions tumeur-stroma.
3. Etudier les mécanismes impliqués dans la résistance aux drogues du PDAC.



## Chapitre 2 : Résultats : Modélisation d'un pancréas « on-chip »

### I. Objectifs

Dans ce chapitre, nous allons aborder la modélisation d'une tumeur pancréatique « on-chip » contenant différents types cellulaires et une MEC sophistiquée permettant de reproduire les signaux biomécaniques et moléculaires observés *in vivo*. Ces paramètres doivent être soigneusement considérés afin d'obtenir un modèle complexe et physiologiquement relevant. Nous aborderons donc les problématiques suivantes :

- D'un point de vue technologique : Quelle géométrie est la plus à même de modéliser de manière pertinente les écoulements et transports de masse d'une tumeur pancréatique ?
- D'un point de vue biologique : Quelles lignées cellulaires choisir, en fonction de leurs caractéristiques, afin d'étudier les interactions tumeur-stroma ? Quelle(s) matrice(s) extracellulaire(s) utiliser pour reproduire le microenvironnement tumoral du PDAC sur les plans biologique et mécanique ?

En réponse à ces problématiques, nous avons développé une approche microfluidique permettant de maintenir une co-culture de cellules de PDAC avec des PSC en 3D et avec l'ajout de microcanaux perfusés servant de substitut à la perfusion vasculaire nécessaire à l'approvisionnement continu en oxygène et en nutriments.

### II. Choix de la géométrie et simulation numérique COMSOL Multiphysics®

*Ces travaux ont été réalisés par **Joseph de Saxcé** (M1 Centrale Lille) en préambule de la thèse et par **Lucie Dercourt** (M1 ISEN Lille) durant la thèse.*

#### 1. Géométrie

La géométrie initiale du dispositif s'inspire de travaux précédents [189], [190] et se base sur trois canaux droits, d'une hauteur de 100  $\mu\text{m}$  et d'une largeur de 1 mm, séparés par des piliers hexagonaux de 100  $\mu\text{m}$  de largeur et espacés de 100  $\mu\text{m}$  (Figure 12A). Les piliers sont utilisés afin de guider la matrice extracellulaire sous forme d'hydrogel, d'éviter qu'elle ne se répande dans les canaux latéraux lors du remplissage du canal central et permettre une communication entre les canaux. Le canal central est utilisé pour la culture cellulaire 3D (cellules + matrice extracellulaire) tandis que les canaux latéraux permettent, eux, un apport contrôlé du milieu de culture et des drogues tout en générant un flux interstitiel à travers le canal central. La région

d'intérêt (R.O.I) est le carré (1 x 1 mm) situé entre les piliers, permettant de visualiser les cellules soumises au flux interstitiel généré *via* les canaux latéraux.

Après les premiers tests expérimentaux, le remplissage du dispositif n'était pas optimal car des fuites vers les canaux latéraux ont été observées à plusieurs reprises. Ce phénomène est décrit dans la littérature comme apparent lorsque la différence de pression intra canal devient supérieure à la différence de pression inter canal. En effet, les différences de pression exercées à l'interface du gel (modélisées par l'équation de Young-Laplace) sont essentielles pour déterminer si une fuite peut se produire, et s'assurer qu'un équilibre est maintenu entre les forces de tension superficielle et les forces capillaires pendant le remplissage car il est nécessaire pour maintenir le gel entre les canaux adjacents. Lors du processus d'injection, une différence de pression est créée à l'interface ce qui entraîne l'hydrogel dans le canal. Au fur et à mesure que le canal et les espaces entre les piliers se remplissent, des différences de pression sont générées aux multiples interfaces de l'hydrogel. Les différences de pression diminuent à mesure que l'interface s'éloigne du site d'injection et augmentent donc la probabilité de débordement dans les canaux latéraux. Il devient nécessaire de trouver une géométrie permettant de maintenir une différence de pression plus importante dans le canal central.

Afin faciliter le remplissage du canal central et d'éviter les débordements dans les canaux latéraux, un dispositif avec un canal central évasé a été développé permettant de créer une différence de pression graduelle le long du canal et ainsi réduire la résistance hydrodynamique. D'après les simulations effectuées avec le module microfluidique de COMSOL Multiphysics®, le différentiel de pression obtenu atteint 1500 Pa (50% de différence) entre l'entrée et la sortie (Figure 12B). Cette nouvelle géométrie (Figure 12C) couplée à l'utilisation de piliers entraîne ainsi un remplissage efficace et simplifié. Elle a permis d'atteindre un taux de remplissage bien plus efficace lors de tests expérimentaux que ce soit avec du collagène I, du Matrigel™ ou Biomimesys® *Oncology* (>95% - Figure 12D).

Toutefois, il est à noter que le remplissage reste dépendant de l'expérimentateur et fonction de la dextérité/expérience de chacun. En effet, afin de proposer un outil « simple » d'utilisation et de répondre à la contrainte de température d'utilisation des hydrogels qui se situe autour de 4°C, le remplissage s'effectue avec une micropipette (voir matériel & méthodes, partie II page 131). Ceci permet d'agir rapidement et d'éviter

la gélification mais il est impossible de contrôler précisément la pression et la vitesse de remplissage.

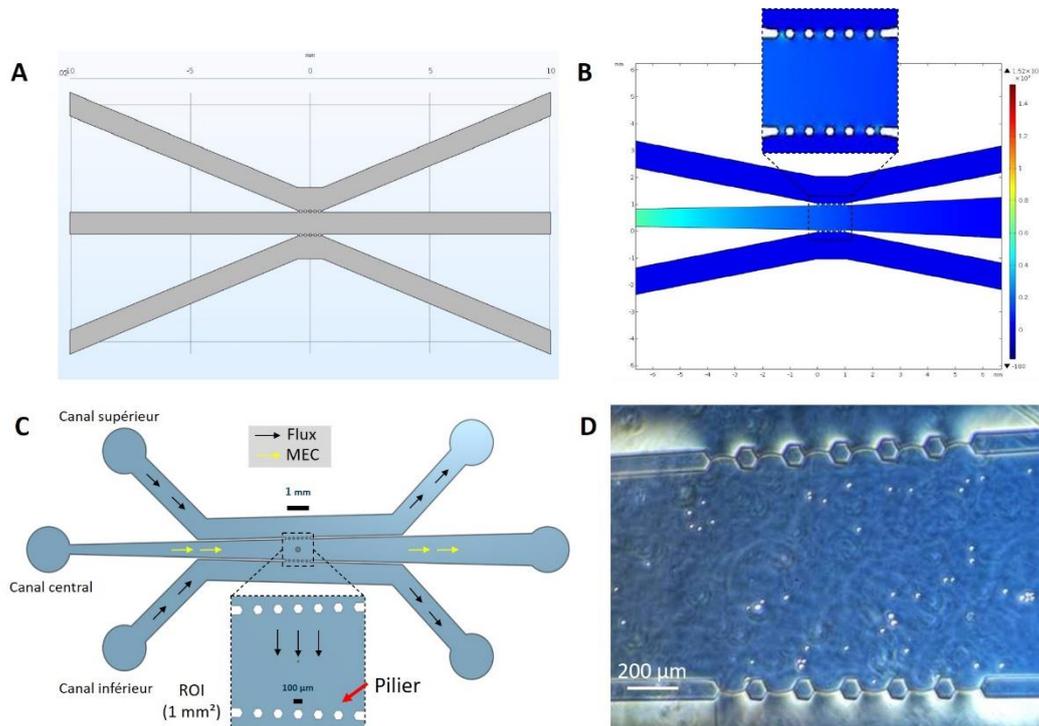


Figure 12. Choix de la géométrie du dispositif microfluidique. A) Géométrie initiale, B) Simulation numérique (COMSOL Multiphysics®) : répartition de la pression lors du remplissage de la géométrie finale avec évasement, C) Géométrie finale, D) Remplissage expérimental avec du Matrigel™.

## 2. Simulation Numérique

### a. Paramètres des simulations

Les simulations ont été réalisées avec le module écoulements réactifs en milieu poreux de COMSOL Multiphysics®. Les équations de Stokes sont utilisées pour décrire l'écoulement du fluide dans les régions d'écoulement libre (canaux latéraux) :

$$\mu \nabla^2 \vec{u} = \nabla p - \rho \vec{f}$$

Avec  $\vec{u}$  le champ de vitesse de l'écoulement,  $p$  la pression du liquide,  $\mu$  la viscosité dynamique,  $\rho$  la masse volumique et  $\vec{f}$  une force massique s'exerçant dans le fluide. Les équations de Brinkman introduites au premier chapitre s'appliquent pour le milieu poreux (canal central).

Afin de calculer le transport de masse, par convection et diffusion, du glucose et de l'oxygène dans notre système microfluidique, ainsi que leur consommation par les cellules de PDAC, nous avons utilisé un modèle décrit dans la littérature par Baydoun *et al.* [191].

Le transport de l'oxygène et du glucose est supposé régi par les équations de transport de masse en régime stationnaire dans le milieu poreux contenant la MEC et les cellules/amas cellulaires de PDAC :

$$R_i = -u\nabla c_i + R_f D_i \Delta c_i$$

Avec  $c_i$  la concentration du réactif  $i$ ,  $D_i$  le coefficient de diffusion du réactif  $i$ ,  $u$  la vitesse d'écoulement du milieu,  $R_f$  le coefficient de retardation de la diffusion dans les milieux poreux. Ce coefficient vaut 1 dans le milieu de culture et dépend de la concentration en glycosaminoglycane (GAG) dans la MEC, donc de HA ( $C_{HA}$ ) [128], [130]. On a, avec  $6,9 \times 10^4 < M_r < 2,8 \times 10^9$  Da, la masse moléculaire du HA :

$$R_f = 1,5 \exp(-8,64 \times 10^{-2} (M_r)^{0,366} (C_{HA})^{0,5})$$

Dans notre modélisation ce coefficient dépend de la porosité  $\epsilon$  :  $R_f = \epsilon^{3/2}$

Enfin,  $R_i$  le taux de consommation du réactif  $i$  dans le milieu poreux. Ce taux est exprimé par le modèle cinétique de Michaelis-Menten :

$$R_i = R_i^{max} \frac{c_i}{c_i + c_i^{max/2}} \delta(c_i > c_{th})$$

Avec  $R_i^{max}$  le taux de consommation maximal du réactif  $i$  dans les cellules,  $c_i^{max/2}$  la constante de Michaelis-Menten (M.M.) qui correspond à la concentration du réactif  $i$  où la consommation tombe à 50% de son maximum,  $c_{th}$  la concentration limite du réactif  $i$  en dessous de laquelle le terme de réaction est nul et  $\delta()$  une fonction permettant d'arrêter la consommation lorsque  $c_i < c_{th}$  [191].

On définit enfin,  $R_{eff,i}$  comme la vitesse réelle moyenne de consommation des réactifs par les cellules, normalisée par rapport à la vitesse de réaction mesurée si la concentration de réactif était uniforme dans le système (concentration en entrée des canaux latéraux dans notre cas) :

$$R_{eff,i} = \frac{(\sum_1^n c_i)/n}{(\sum_1^n c_i)/n + c_i^{max/2}} \bigg/ \frac{c_{i,0}}{c_{i,0} + c_i^{max/2}}$$

Avec  $i$  le réactif (dans notre cas l'oxygène ou le glucose),  $n$  le nombre de nœuds mathématiques pris en comptes pour le calcul des concentrations et  $c_{i,0}$  la concentration maximale d'oxygène ou de glucose entrant dans le système.

Tableau 2. Paramètres utilisés lors des simulations et adaptés de Baydoun *et al.* [191]

Paramètre	Unité	Milieu aqueux	Milieu poreux
Masse volumique	kg/m <sup>3</sup>	1000	-
Viscosité	Pa.s	10 <sup>-3</sup>	-
Porosité	-	-	0,994
Perméabilité de Darcy	m <sup>2</sup>	-	5 x 10 <sup>-12</sup>
Coefficient de diffusion de l'oxygène	m <sup>2</sup> /s	2,69 x 10 <sup>-9</sup>	2,69 x 10 <sup>-9</sup>
Coefficient de diffusion du glucose	m <sup>2</sup> /s	9,25 x 10 <sup>-10</sup>	4 x 10 <sup>-11</sup>
Coefficient de retardation	-	1	0,97
Taux de consommation maximal en oxygène	mol/m <sup>3</sup> /s	-	1,28 x 10 <sup>-4</sup>
Taux de consommation maximal en glucose	mol/m <sup>3</sup> /s	-	4,48 x 10 <sup>-4</sup>
Concentration limite en oxygène	mol/m <sup>3</sup>	-	10 <sup>-4</sup>
Concentration limite en glucose	mol/m <sup>3</sup>	-	25 x 10 <sup>-3</sup>
Concentration initiale en oxygène	mol/m <sup>3</sup>	0,174	0,174
Concentration initiale en glucose	mol/m <sup>3</sup>	25	25
Constante de M.M. oxygène	mol/m <sup>3</sup>	-	2 x 10 <sup>-2</sup>
Constante de M.M. glucose	mol/m <sup>3</sup>	-	10 <sup>-3</sup>
Vitesse d'entrée canal supérieur	µm/s	100	-
Vitesse d'entrée canal inférieur	µm/s	0	-
Pression de sortie canal supérieur	Pa	0	-
Pression de sortie canal inférieur	Pa	0	-

Parmi ces paramètres, il est important de choisir une perméabilité de Darcy<sup>9</sup> correspondant aux caractéristiques de la MEC de notre modèle. Si celle-ci n'est pas adaptée, l'étude de la vitesse du flux interstitiel et les gradients d'oxygène et de glucose générés dans le canal central (milieu poreux) par les canaux latéraux ne sera pas pertinente, et les paramètres calculés ne pourront être transposés dans notre modèle expérimental. Dans la littérature, les valeurs de perméabilité rapportées varient en fonction des conditions d'utilisation et de la nature de la MEC (Tableau 3).

Tableau 3. Valeurs de la perméabilité de Darcy en fonction des matrices

Matrice Extracellulaire	Perméabilité (m <sup>2</sup> )	Ref.
Matrigel™ sans cellules	1,5 x 10 <sup>-16</sup>	[192]
Gel de fibrine sans cellules	1,5 x 10 <sup>-13</sup>	[192], [193]
Collagène sans contrainte de pression sans cellules	1 x 10 <sup>-16</sup>	[143], [194]
Collagène avec contrainte de pression sans cellules	5,7 x 10 <sup>-15</sup> à 8,2 x 10 <sup>-15</sup>	[194]
Collagène hydraté sans cellules	8,5 x 10 <sup>-13</sup>	[194]
<b>Collagène hydraté avec cellules</b>	6,4 x 10 <sup>-12</sup> à 6,2 x 10 <sup>-11</sup>	[195]

Nous avons choisi de travailler avec  $k = 5 \times 10^{-12}$  ce qui correspond au collagène hydraté avec cellules, cas de notre modèle d'étude expérimental.

#### **b. Simulation du flux interstitiel et du transport de masse en milieu poreux**

L'objectif des simulations est de définir les paramètres physiques nous permettant d'obtenir une pertinence physiologique au sein de notre modèle d'étude lors de la partie expérimentale, avec notamment la génération d'un flux interstitiel de l'ordre de 2 à 4 µm/s et d'un gradient de nutriments. En plus du module « écoulements réactifs en milieu poreux », nous avons introduit deux fonctions correctives afin d'estimer au mieux les transports de masses et la consommation du glucose et de l'oxygène :

- La correction de Bruggeman permettant d'estimer les concentrations effectives en prenant en compte l'écoulement en milieu poreux et les effets de diffusion (tortuosité) pour corriger les paramètres de transport de masse.

<sup>9</sup> Mesure l'aptitude d'un milieu poreux à se laisser traverser par un fluide sous l'effet d'un gradient de pression

- Une fonction Heavyside permettant de fixer une valeur seuil à partir de laquelle les cellules ne consomment plus d'oxygène ni de glucose, définie de la manière suivante :
  - Si  $c_i \leq c_{th}$  alors la fonction Heavyside est nulle
  - Si  $c_i > c_{th}$  alors la fonction Heavyside est égale à 1

Avec  $c_i$  la concentration du réactif  $i$  (oxygène ou glucose) et  $c_{th}$  la concentration limite du réactif  $i$  en dessous de laquelle le terme de réaction est nul.

Grâce à ces fonctions, en utilisant les équations et paramètres décrits précédemment (Tableau 2), nous avons obtenu les résultats suivants :

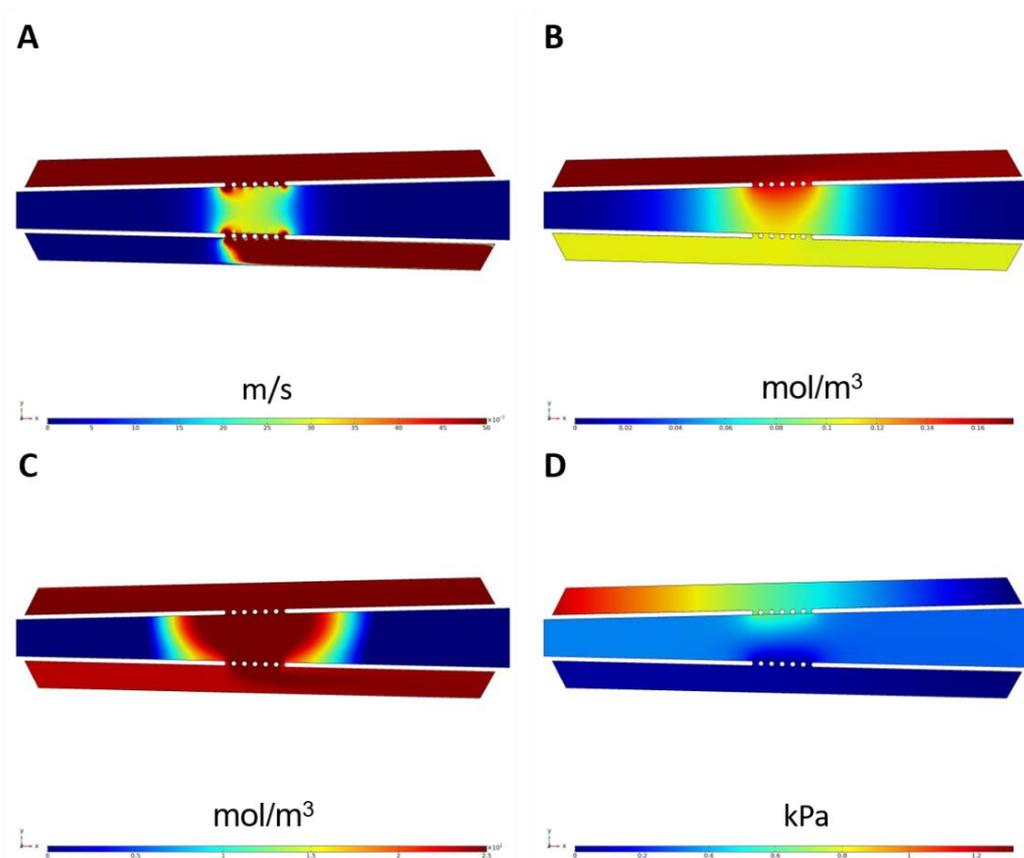


Figure 13. Simulations numériques avec COMSOL Multiphysics®. A) Profil de vitesse des flux dans le système (m/s), B) Répartition de la concentration de l'oxygène (mol/m<sup>3</sup>), C) Répartition de la concentration du glucose (mol/m<sup>3</sup>), D) Profil de répartition de la pression (kPa).

Nous observons que le flux interstitiel généré atteint  $2,5 \mu\text{m/s}$  avec les paramètres utilisés (Figure 13A), ce qui est du même ordre de grandeur que les vitesses mesurées *in vivo* [146], [147]. Ce modèle de convection-diffusion, nous permet aussi de quantifier les concentrations d'oxygène et de glucose (Figure 13B et 13C). Nous obtenons un gradient le long du canal central avec une concentration dans la zone de convection, entre les piliers, plus importante que dans le reste du canal pour le glucose et pour

l'oxygène, créant une zone d'hypoxie caractéristique d'une tumeur pancréatique. Ceci démontre que dans notre modèle, la convection est plus importante que la diffusion. Enfin, nous n'atteignons pas les pressions observées *in vivo* (Figure 13D) de 10 à 60 mmHg contre 3 mmHg dans notre cas. Comme expliqué dans l'introduction, la pression interne est à la fois générée par les flux hydrostatique et osmotique mais aussi par la contrainte solide créée par les tissus environnant et les cellules, or notre modèle numérique ne prend pas en compte ces deux derniers effets.

### **III. Fabrication et optimisation du modèle d'étude**

#### **1. Microfabrication**

Le protocole de fabrication complet, décrit dans le matériel et méthodes (partie I page 123), suit les recommandations « classiques » [196], [197]. Brièvement, un moule de 100  $\mu\text{m}$  d'épaisseur en SU-8 a été fabriqué par la photolithographie puis des répliques de polydiméthylsiloxane (PDMS) ont été obtenues par lithographie douce. Le PDMS est globalement utilisé dans le monde de la microfluidique du fait de sa biocompatibilité, son faible coût, sa perméabilité et ses propriétés optiques. Une fois le PDMS cuit et démoulé, les entrées et sorties des canaux sont perforées avec un poinçon de biopsie. Afin de fermer le système, le PDMS a été collé à une lame de verre en utilisant un plasma  $\text{O}_2$ . Les tubes, permettant une connexion au circuit fluidique, ont ensuite été scellés avec du PDMS dans les trous préalablement perforés. Nous avons simplement ajouté une étape par rapport aux recommandations, une fois le moule en SU-8 terminé, un dépôt antiadhésif de fluoroforme ( $\text{CHF}_3$ ) a été réalisé afin de faciliter le démoulage car il y a une forte affinité entre le silicium et le PDMS.

#### **2. Choix et caractérisation des lignées cellulaires pancréatiques**

L'objectif de cette partie est de caractériser les lignées cellulaires pancréatiques et valider les marqueurs d'intérêt dans l'optique d'étudier les interactions tumeur-stroma et la résistance aux drogues (chapitre 3). A l'issue de cette caractérisation les lignées les plus pertinentes seront choisies afin de réaliser une co-culture dans notre modèle *in vitro* 3D et microfluidique. Le choix prendra en compte les paramètres suivants :

- L'activation des PSC : expression de l' $\alpha$ -SMA
- La sécrétion de MEC par les PSC : expression de la fibronectine
- Le phénotype mésenchymateux : expression de la vimentine
- Le phénotype épithélial : expression de l'E-Cadhérine

Ces deux derniers marqueurs nous permettront aussi de mettre en évidence une éventuelle TEM, augmentation de l'expression de la vimentine et réduction de l'expression de l'E-Cadhérine, lors des co-cultures et des traitements (chapitre 3).

### a. Caractérisation morphologique

Nous avons réalisé nos cultures et nos tests d'optimisation avec la lignée cellulaire stellaire pancréatique humaine PS-1 et trois lignées cellulaires cancéreuses pancréatiques humaines, MiaPaCa-2, PANC-1 et Capan-2 (Figure 14). L'origine exacte des lignées est décrite dans le matériel et méthodes (partie II page 127). Les PS-1 sont des cellules très peu différenciées et présentent une morphologie fusiforme proliférant de manière désorganisée et non jointive [198]. Les MiaPaCa-2 et les PANC-1 sont des cellules ayant perdu certains marqueurs épithéliaux et présentant un caractère mésenchymateux. Les MiaPaCa-2 sont peu différenciées, possèdent une morphologie fusiforme et prolifèrent en monocouche de façon adhérente et non jointive [199]. Les PANC-1 sont, elles aussi, peu différenciées mais possèdent une morphologie ronde et prolifèrent en monocouche de façon adhérente et jointive [200]. Enfin, les Capan-2 sont, quant à elles, bien différenciées, possèdent une morphologie polygonale et prolifèrent en monocouche de façon adhérente, organisée et jointive (Figure 14) [201].

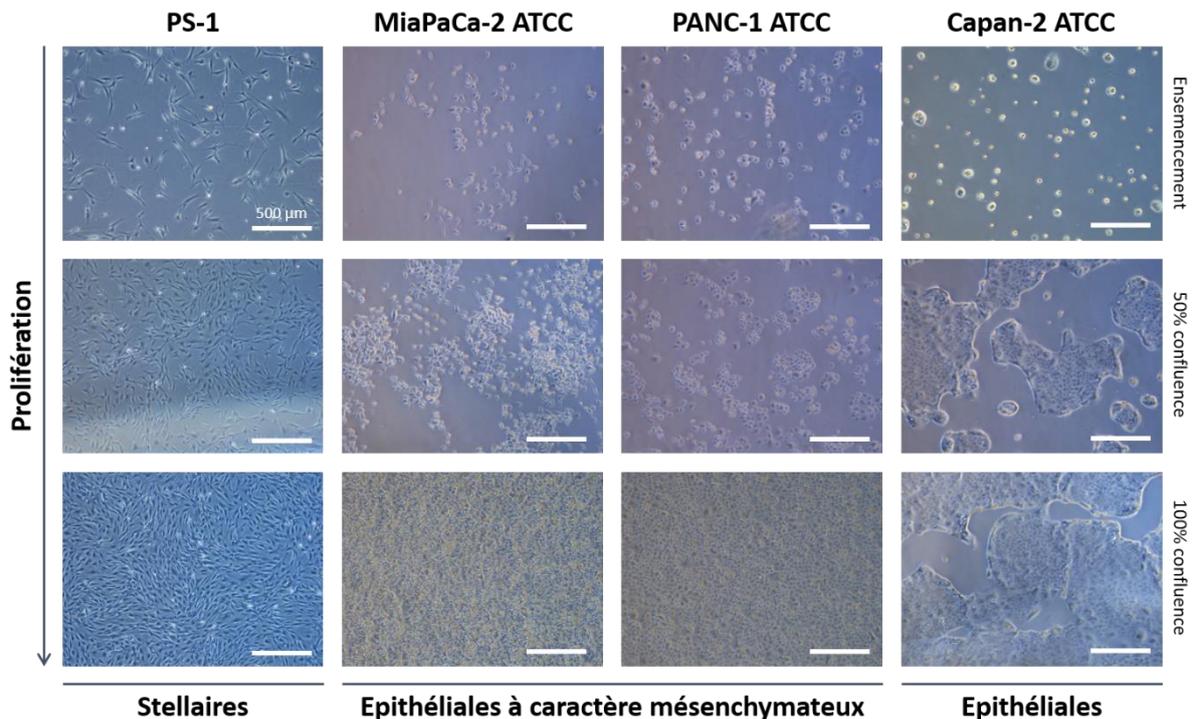


Figure 14. Morphologie et croissance des lignées cancéreuses pancréatiques humaines. Echelle 500 µm.

## **b. Expression des marqueurs**

Afin de caractériser et valider l'expression de marqueurs épithéliaux (E-Cadhérine) ou mésenchymateux (vimentine) dans les lignées cellulaires cancéreuses pancréatiques, ainsi que l'activation ( $\alpha$ -SMA) des PSC et leur sécrétion de protéines de la MEC (fibronectine), des Western blots et des immunomarquages fluorescents sur des cultures 2D classiques ont été réalisés.

L'E-Cadhérine est une protéine jouant un rôle d'adhésion cellulaire, impliquée dans les mécanismes de régulation de l'adhérence cellule-cellule, de mobilité et de prolifération des cellules épithéliales [202].

La vimentine est un filament intermédiaire de classe III qui se trouve dans les cellules mésenchymateuses [203]. Comme l'E-Cadhérine, elle joue un rôle dans l'adhérence et la cohésion cellulaire, ainsi que sur la morphologie et la rigidité des cellules.

Durant la TEM, une diminution ou perte d'expression de l'E-Cadhérine est associée à une néo-expression de la vimentine et donc à une restructuration morphologique de la cellule [26]–[28].

L' $\alpha$ -SMA est une protéine jouant un rôle dans la motilité cellulaire, c'est aussi un marqueur d'activation des PSC [68].

La fibronectine, est une protéine sécrétée à la surface des cellules. Elle se lie à divers composés, notamment le collagène. La fibronectine est impliquée dans l'adhésion cellulaire, la motilité cellulaire, la cicatrisation des plaies et le maintien de la forme « cellulaire ». Elle participe aussi à la régulation du dépôt de collagène de type I.

### **Analyse de l'expression par Western blotting**

L'analyse de l'expression a été réalisée à partir d'extraits protéiques totaux obtenus soit à partir de cellules en phase proliférative (J2 : 60% de confluence) soit en phase stationnaire (J8 : confluence totale). Les protéines ont ensuite été séparées par électrophorèse puis révélées grâce à des anticorps spécifiques par Western blotting (Figure 15).

Comme attendu, nous observons une expression importante de l'E-Cadhérine dans les Capan-2 alors qu'elle est très faible dans les PANC-1. L'expression est constante à J2 et à J8 pour les deux lignées. Ceci valide leur mode de prolifération adhérent et jointif ainsi que leur phénotype plus ou moins différencié.

Le caractère mésenchymateux des MiaPaCa-2 et des PANC-1 est confirmé par l'absence ou la diminution d'expression de l'E-Cadhérine. Comme attendu, il n'y a pas d'expression d'E-Cadhérine dans la lignée stellaire PS-1.

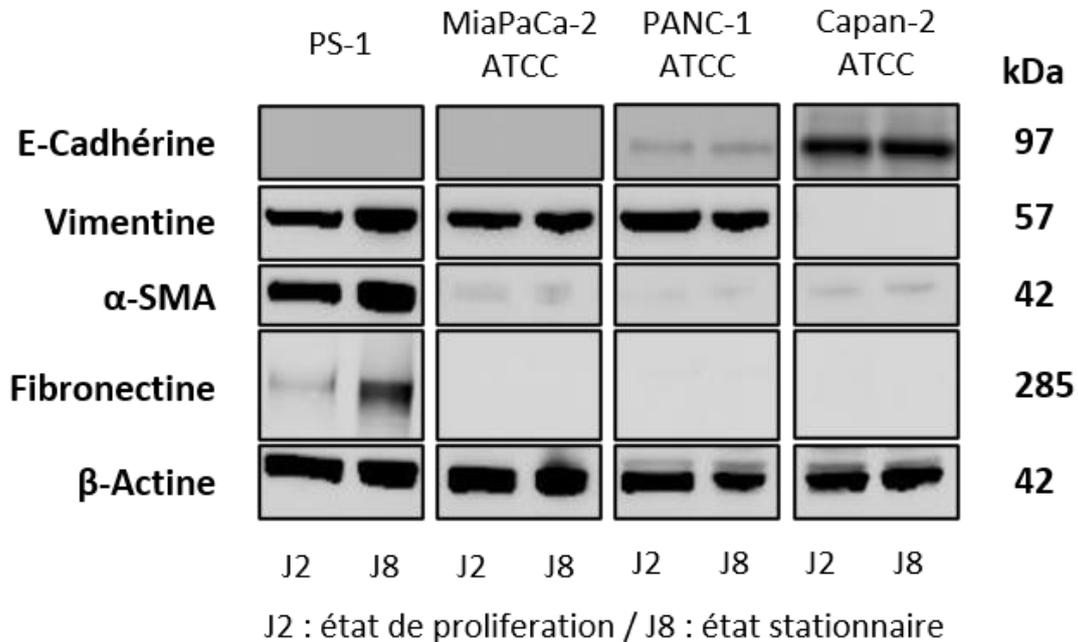


Figure 15. Expression des marqueurs d'intérêt. Etude de l'expression de l'E-Cadhérine (dilution 1/1000, 97kDa), la vimentine (1/1000, 57kDa), l'α-SMA (1/1000, 42kDa) et la fibronectine (1/1000, 295kDa) par Western-blotting, 20 µg d'extrait protéique ont été déposés dans chaque puits.

La vimentine est fortement exprimée de manière constante à J2 et J8 dans les PS-1, les MiaPaCa-2 et les PANC-1. Cette expression confirme le caractère mésenchymateux et la morphologie fusiforme des PS-1 et des MiaPaCa-2. Ce résultat est aussi corrélé avec la diminution/perte de l'E-Cadhérine dans les PANC-1 et les MiaPaCa-2.

L'α-SMA est très fortement exprimée dans les PS-1, ce qui confirme l'activation de la lignée. Comme attendu, son expression est très faible, voire nulle, dans les lignées tumorales.

En ce qui concerne la fibronectine, nous la retrouvons exprimée uniquement dans les PS-1 avec une forte augmentation à J8 lorsque les cellules deviennent confluentes. Ceci démontre qu'une fois à confluence, les PS-1 activées créent une MEC dense autour d'elles.

Les résultats obtenus valident donc le phénotype de nos lignées ainsi que la pertinence des marqueurs étudiés.

## Analyse de l'expression par immunomarquages fluorescents

La collecte de cellules à la fin des expériences dans le dispositif microfluidique est impossible. Nous devons donc mettre en place une autre méthode d'analyse pour caractériser l'expression de ces marqueurs dans ce modèle.

Grâce aux propriétés optiques du PDMS, la méthode alternative pouvant être mise en place pour analyser l'expression des marqueurs d'intérêt est l'immunomarquage fluorescent suivi d'une acquisition d'images avec un microscope confocal. Nous avons tout d'abord réalisé cette expérience sur des cultures 2D classiques avec trois objectifs :

- Valider l'expression des marqueurs obtenue par Wertern Blotting
- Valider le protocole d'immunomarquage afin de l'adapter à notre modèle microfluidique
- Valider les anticorps utilisés afin d'avoir des marquages spécifiques

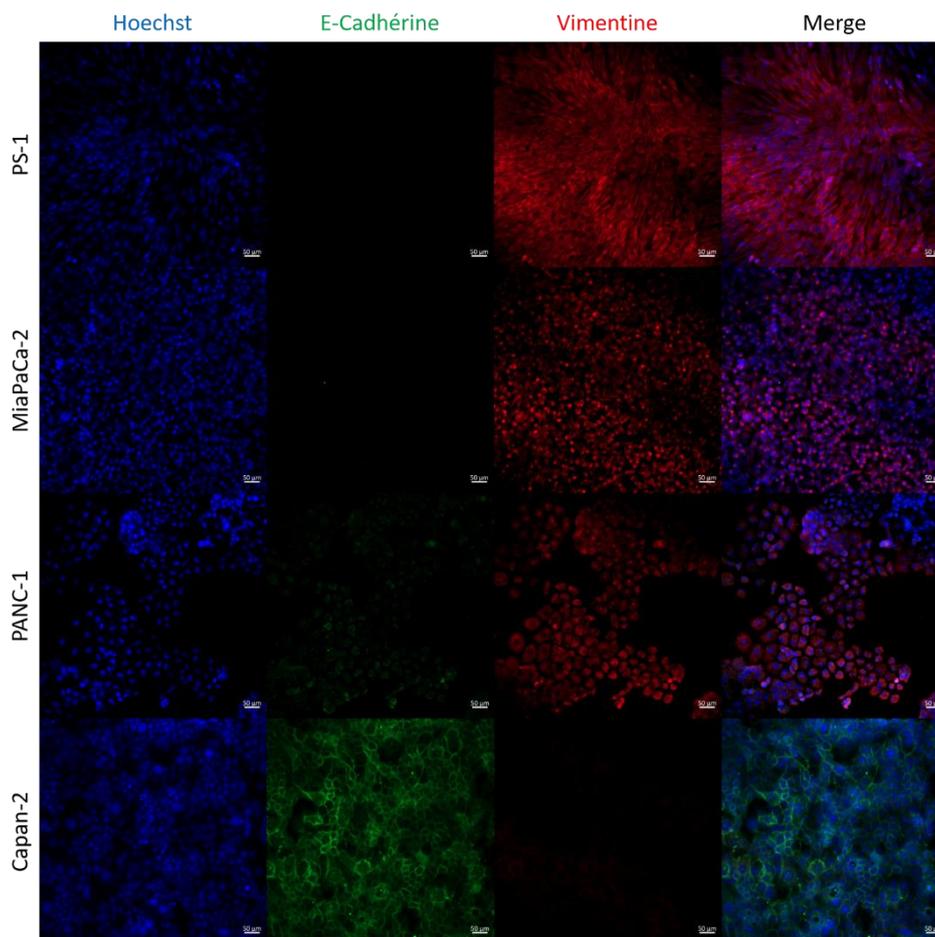


Figure 16. Etude de l'expression de l'E-Cadhérine et la vimentine dans les modèles cellulaires pancréatiques. Dilution des anticorps primaires 1/100 et 1/200 pour les secondaires. Co-marquages avec le Hoechst (noyau). Marquages réalisés à 100% de confluence. Imagerie confocale : échelle 50 μm

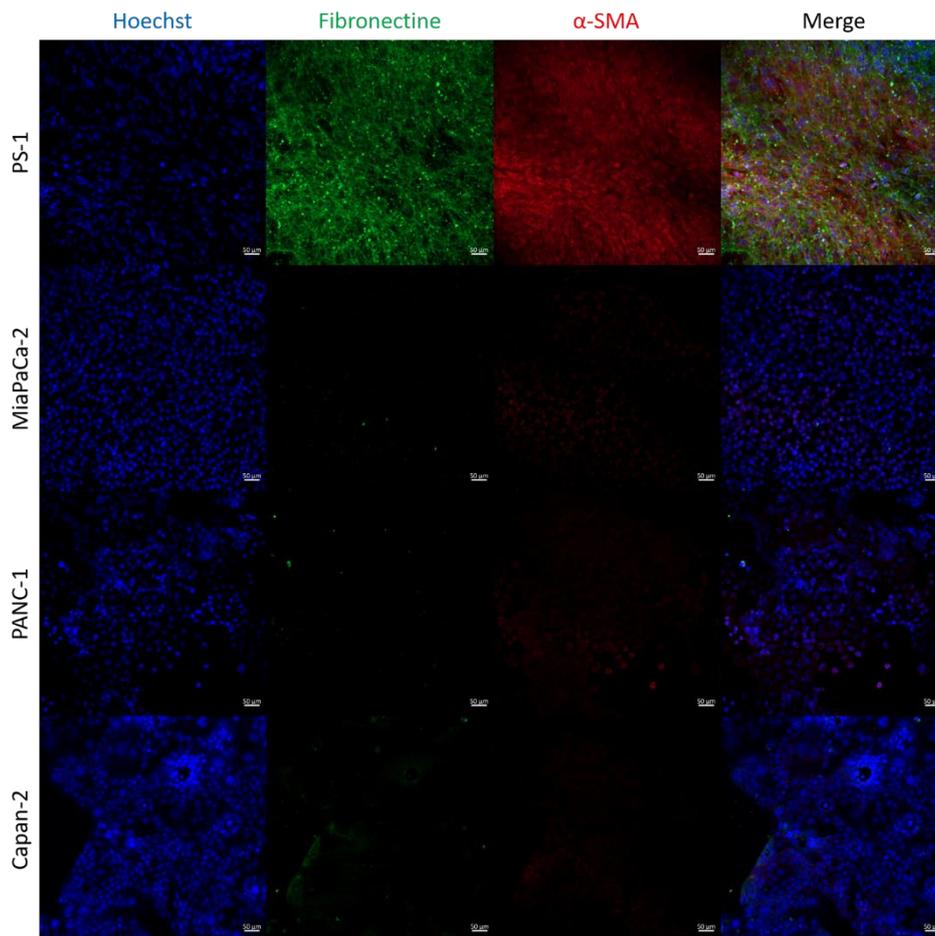


Figure 17. Etude de l'expression de la fibronectine et l' $\alpha$ -SMA dans les modèles cellulaires pancréatiques. Dilution des anticorps primaires 1/100 et 1/200 pour les secondaires. Co-marquages avec le Hoechst (noyau). Marquages réalisés à 100% de confluence. Imagerie confocale : échelle 50  $\mu$ m.

Ces marquages nous permettent de valider l'expression des marqueurs d'intérêt obtenue par Western blotting ainsi que la localisation de l'expression des protéines (Figures 16 et 17). Nous observons une expression membranaire de l'E-Cadhérine dans les Capan-2 et cytoplasmique dans les PANC-1. La vimentine est exprimée dans le cytoplasme autour du noyau dans les PS-1, MiaPaCa-2 et PANC-1. Comme en Western Blot, la fibronectine et l' $\alpha$ -SMA ne sont exprimées que par les PS-1. La localisation de l' $\alpha$ -SMA est cytoplasmique tandis que la fibronectine est exprimée à la surface des cellules.

Ces immunomarquages valident donc nos trois objectifs : la caractérisation des lignées, le protocole d'immunomarquage qui sera ensuite adapté pour une utilisation dans le système microfluidique, voir matériel et méthodes (partie V page 137), et la qualité/spécificité des anticorps utilisés.

### **3. Choix de la matrice extracellulaire**

Afin de développer un modèle d'étude pertinent, les propriétés et les composants de la MEC doivent être systématiquement intégrés dans les approches 3D. Il est décrit dans la littérature que les cellules détectent la rigidité environnante, ce qui peut conduire à l'induction d'une TEM [204], [205] ou à la modification du comportement cellulaire. Par conséquent, il est possible que les systèmes de cultures microfluidiques basés sur du PDMS sans l'inclusion d'une matrice appropriée puissent modifier le comportement des cellules PDAC. Dans cette partie, nous avons décrit le processus de sélection de la matrice la plus à même de répondre à notre problématique. Nous nous sommes basés sur trois critères :

- Les propriétés physiques : module élastique/rigidité
- L'aspect technologique : remplissage du dispositif microfluidique et résistance aux flux.
- L'aspect biologique : activation des PSC et viabilité

#### **a. Matrigel™**

Notre premier choix s'est porté sur le Matrigel™ (Corning®), composé de laminine et de collagène IV, afin de pouvoir comparer les résultats obtenus dans notre modèle à ceux obtenus précédemment au laboratoire en culture 3D de cellules ou d'organoïdes. Du point de vue physique, son module élastique est estimé à 0,45 kPa [206]. Du point de vue technologique, le remplissage est réalisable avec un grand taux de réussite mais le maintien de la culture à long terme dans la zone des flux n'est pas possible car le Matrigel™ se dégrade sous l'effet des écoulements et de la production par les cellules tumorales d'enzymes dégradant cette matrice (Figure 19). Après plusieurs jours de culture, les PSC migrent sous le gel, en dégradant la matrice, pour proliférer en 2D (Figure 18A). En 3D, les PSC sont désactivées mais bien vivantes (Figure 18B). Cette observation a également été faite au laboratoire par le groupe du Dr Vincent dans des cultures primaires de tissus issus de patients en dôme de Matrigel™.

#### **b. Collagène I**

Nous nous sommes alors tourné vers le collagène I (Corning®), qui possède un module élastique de 0,6 kPa pour une concentration à 2 mg/ml [207]. Le remplissage dans le dispositif est un succès mais comme avec le Matrigel™, nous observons une dégradation et il ne résiste pas au flux après plusieurs jours de culture (Figure 19).

D'un point de vue biologique, la présence d'un réseau cellulaire et la morphologie stellaire des PS-1 mettent en évidence une activation de celles-ci (Figure 18B).

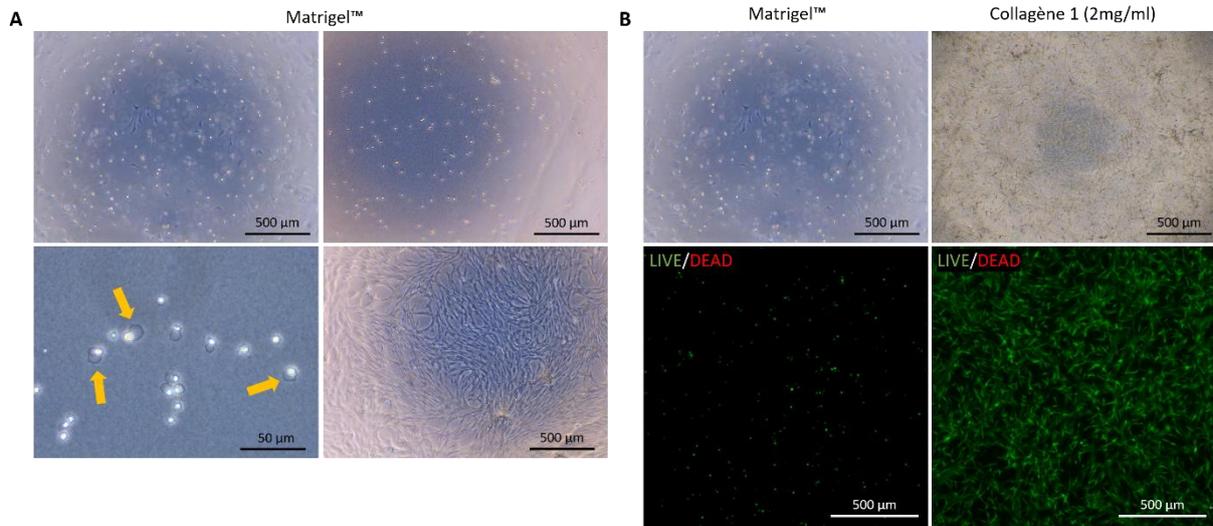


Figure 18. Activation des PSC en culture 3D. A) Culture 3D des PSC dans du Matrigel™. Observation de la migration des PSC sous le gel en le dégradant (flèche orange). B) Culture 3D des PSC dans du Matrigel™ (gauche) ou dans du collagène I (2 mg/ml) (droite). Les PSC sont désactivées dans le Matrigel™ (morphologie ronde) tandis que dans le collagène, elles forment un réseau et ont leur morphologie stellaire. Les tests Live (Calcein AM, vert) / Dead (EthD-1, rouge) attestent que les PSC sont vivantes.

### c. BIOMIMESYS® *Oncology*

Grâce à une collaboration avec la société HCS Pharma, nous avons ensuite pu tester la matrice BIOMIMESYS® *Oncology*, composée de HA et de collagène I et présentant un module élastique de 1 kPa (donnée fournisseur). Le remplissage de la matrice dans le dispositif est faisable, mais il n'est pas possible d'y introduire les cellules en même temps car il faut attendre la lyophilisation du gel (process HCS Pharma). Après cette étape, la matrice se présente sous forme d'un « scaffold » déshydraté poreux. Malheureusement, les pores étant trop larges, lors de l'ensemencement, les cellules ne se fixent pas dans le canal central et sont donc évacuées par le flux (Figure 19).

### d. Composite BIOMIMESYS® *Oncology* + collagène I

Finalement, nous avons choisi d'effectuer une association de BIOMIMESYS® *Oncology* et de collagène I (Corning®). Le remplissage des cellules se fait alors avec le collagène I (2 mg/ml) après l'étape de lyophilisation. Après gélification, les pores sont remplis et les cellules peuvent proliférer. Cette méthode permet un maintien de la culture dans la région soumise aux flux interstitiel (Figure 19). Comme avec le collagène, les PSC sont activées.

Les valeurs de modules élastiques des différentes matrices testées peuvent paraître faibles en comparaison des mesures *in vivo*, 1,89 à 13,7 kPa pour le PDAC [124], [205], mais ces mesures s'appliquent à l'ensemble de la tumeur. Nous cherchons à modéliser une tumeur complète (au niveau de la composante cellulaire en présence de PSC et de cellules tumorales, et au niveau de la composante matricielle) or la rigidité seule de l'hydrogel ne représente pas la tumeur. Nous avons vu en introduction que la rigidité des cellules cancéreuses était évaluée pour des PANC-1 à 2,5 kPa. Si on ajoute la matrice utilisée, le réseau créé par le PSC, les protéines de la MEC sécrétées et les cellules tumorales, la rigidité totale sera alors bien plus grande et proche des mesures *in vivo*. Nous n'avons toutefois pas pu la mesurer.

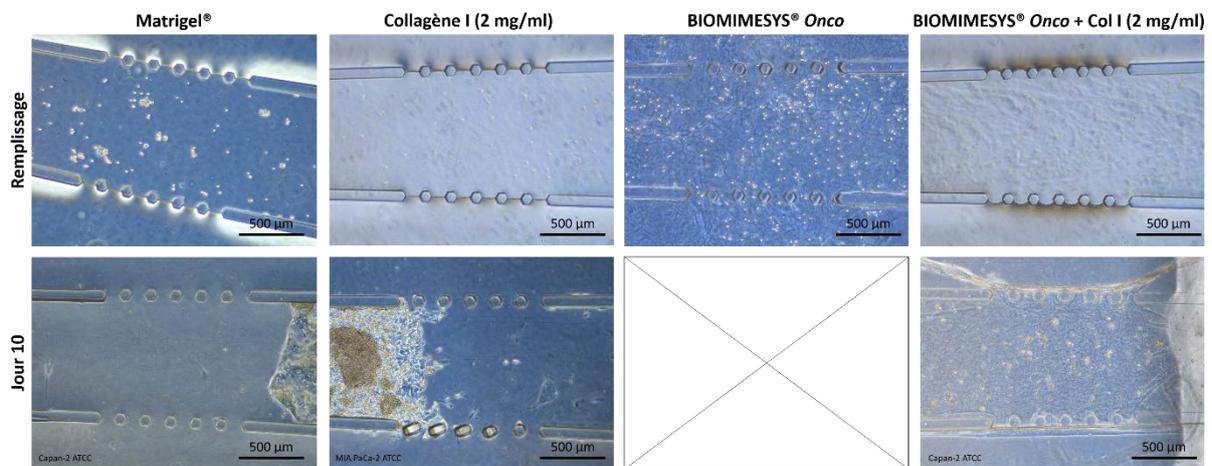


Figure 19. Etude du remplissage et du maintien de la culture cellulaire dans le dispositif microfluidique en présence de différents types de matrice.

En définitive, nous avons développé un modèle comprenant une matrice extracellulaire compatible avec la méthode de remplissage, résistante au flux interstitiel, contenant du HA et du collagène I, et permettant l'activation des cellules stellaires.

Bien que la matrice soit résistante au flux, il est très important de ne pas faire rentrer de bulles dans le dispositif car cela l'endommagerait ainsi que les cellules. L'ajout d'un système, commercial ou non, permettant de bloquer les bulles en amont du dispositif est recommandé. Il peut être difficile de les éliminer complètement.

#### 4. Caractérisation des écoulements et du transport de masse

La dernière étape du processus de mise au point du modèle de culture microfluidique est de caractériser expérimentalement le flux interstitiel généré et le transport de masse dans le canal central. Afin de répondre à cette question, nous avons utilisé de la fluorescéine, qui est une molécule fluorescente sous ultraviolet, diluée dans un

tampon de phosphate salin Dulbecco 1X (DPBS) à 1 mg/ml. Nous avons ensuite perfusé le canal supérieur à une vitesse de 100  $\mu\text{m/s}$ , débit de 10 nl/s à la pompe, et observé l'avancée du front de fluorescéine (voir matériel et méthodes, partie VIII page 145).

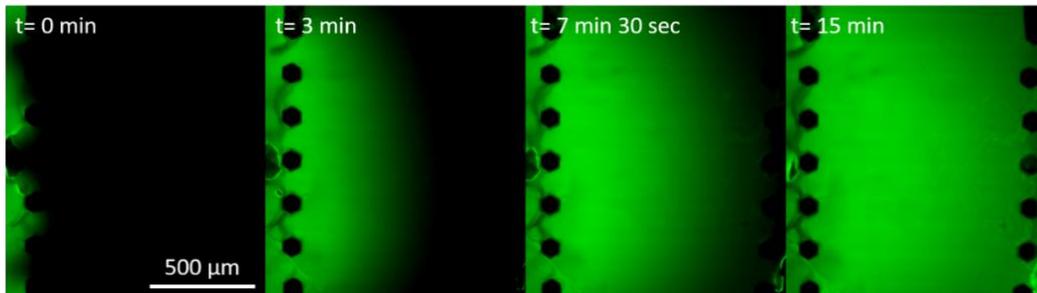


Figure 20. Caractérisation du flux interstitiel dans la matrice BIOMIMESYS® *Oncology* + collagène I. Etude de l'avancée du front de la fluorescéine (1 mg/ml) à différents temps. La vitesse d'écoulement dans le canal supérieur est de 100  $\mu\text{m/s}$ .

Après une analyse image par image (Figure 20), nous obtenons une vitesse moyenne de l'écoulement interstitiel de :  $V_{interstitiel} = 2,493 \pm 0,152 \mu\text{m/s}$ . Cette valeur correspond aux vitesses observées *in vivo* [146], [147] et valide notre modèle numérique.

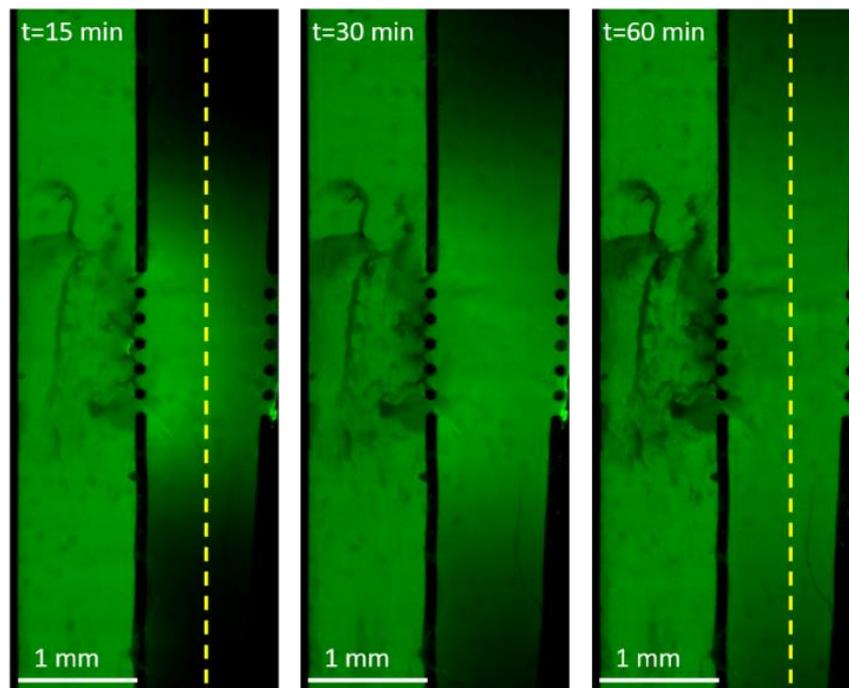


Figure 21. Caractérisation du transport de masse par diffusion dans la matrice BIOMIMESYS® *Oncology* + collagène I. Etude de l'avancée du front de la fluorescéine (1mg/ml) à différents temps dans le canal central. La vitesse d'écoulement dans le canal supérieur est de 100  $\mu\text{m/s}$ . En trait pointillé, la ligne d'intérêt pour calculer l'intensité lumineuse.

L'étude de diffusion est réalisée en traçant la répartition de l'intensité lumineuse le long du canal central (Figure 21). Au bout d'une heure, nous pouvons observer un plateau dans la zone de convection, la concentration est alors égale à la concentration du

canal latéral, et le gradient diminue de manière linéaire le long du canal, avec environ 25% de diminution par mm à partir de 1,3 mm depuis le centre (Figure 22). Ce résultat semble éloigné des prédictions faites avec le modèle numérique de convection-diffusion, mais le modèle expérimental ne prend pas en compte l'effet des cellules sur la consommation du réactif et la barrière physique qu'elles génèrent, ralentissant la diffusion. Cependant, la fluorescéine devrait moins bien diffuser que les molécules d'oxygène ou de glucose, or nous observons qu'elle diffuse largement le long du canal. Le gradient généré n'est donc pas représentatif de ces molécules.

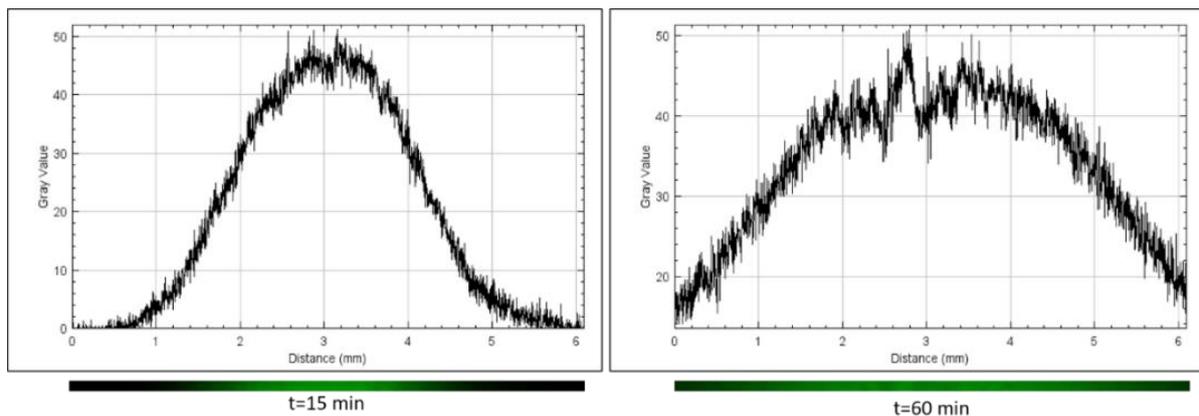


Figure 22. Caractérisation du transport de masse par diffusion dans la matrice BIOMIMESYS® *Oncology* + collagène I. Courbes d'intensité de la fluorescéine (1 mg/ml) à différents temps le long du canal central. La vitesse d'écoulement dans le canal supérieur est de 100  $\mu\text{m/s}$ .

### 5. Conditions de culture

Nous dressons ici un rapide bilan des paramètres de culture de notre modèle *in vitro* 3D microfluidique. Le flux appliqué dans le canal supérieur est fixé à 100  $\mu\text{m/s}$ , la matrice extracellulaire utilisée est une association de BIOMIMESYS® *Oncology* et de collagène I à une concentration de 2 mg/ml, la densité cellulaire est fixée à  $2 \times 10^6$  cellules/ml de collagène, et en co-culture nous utiliserons un ratio cellules tumorales : PSC de 1:3 [71], [179]. La lignée tumorale utilisée est la lignée Capan-2 (Figure 23).

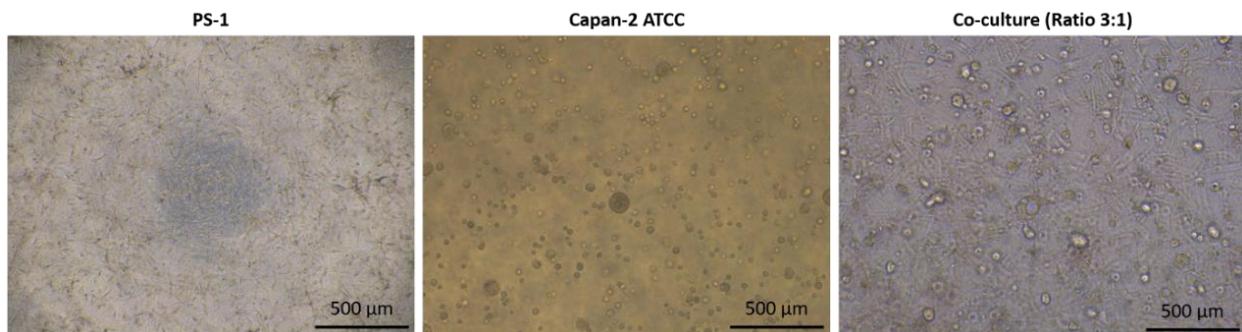


Figure 23. Mono et co-culture 3D des PSC et des Capan-2 dans des dômes de collagène I (2 mg/ml), une densité de  $2 \times 10^6$  de cellules/ml de collagène, un ratio PS-1 : Capan-2 (3:1).

#### IV. Discussion

Dans cette première partie des résultats, nous avons démontré la faisabilité d'un modèle complexe de culture 3D *in vitro* microfluidique permettant l'étude du comportement des cellules cancéreuses du pancréas. Il combine l'ensemble des conditions physiologiques pertinentes d'une tumeur pancréatique à savoir :

- Une matrice extracellulaire rigide associant du collagène I et du HA créant une architecture proche des conditions *in vivo*.
- Une co-culture de cellules tumorales et de PSC permettant de visualiser et d'étudier leurs interactions.
- Un environnement dynamique mimant la perfusion vasculaire permettant l'approvisionnement continu en oxygène et en nutriments, et l'élimination des déchets de manière automatisée. Ce modèle permet également d'appliquer une combinaison de pression hydrostatique et de contrainte de cisaillement sur les cellules *via* la génération d'un flux interstitiel à travers le canal central.

Nous avons réussi à regrouper l'intégralité de ces paramètres en choisissant une géométrie « simple » et commune dans le monde des organes sur puces [179], [208], [209]. Le choix du PDMS comme matériau de fabrication peut néanmoins être remis en question car il peut absorber les petits composants organiques comme les drogues de chimiothérapie [210]. Des matériaux alternatifs comme le polystyrène (PS), le polyméthacrylate de méthyle (PMMA), le polycarbonate (PC) ou encore les copolymères d'oléfine cyclique (COC), peuvent être utilisés mais nécessitent des techniques de moulage par injection ou d'extrusion difficiles à mettre en œuvre et pouvant présenter des résolutions plus faibles. Le PDMS reste donc plus simple d'utilisation. De plus, la géométrie ne présente pas que des avantages. Bien qu'une amélioration soit apportée par l'évasement du canal central et permette un remplissage efficace, celui-ci dépend de l'utilisateur. De plus, le contact direct entre la matrice extracellulaire et le flux entraîne une dégradation importante de l'hydrogel. Ainsi, l'ensemble des solutions proposées en termes de MEC pour l'étude du PDAC n'est pas applicable dans notre géométrie et requiert une grande attention lors de sa sélection, nous discuterons de ce point un peu plus tard. Nous avons aussi constaté qu'il était très compliqué de faire des expériences à débit élevé comme peuvent le permettre les cultures 2D et 3D classiques ou les systèmes microfluidiques OrganoPlates® [180]. Ces points représentent un réel frein pour que notre modèle

puisse être un outil d'étude viable en recherche sur le développement de nouvelles thérapies. Afin de répondre à ces problématiques, il existe un système récent de coculture 3D microfluidique développé par Chi *et al.* en 2020. Ce dernier utilise une membrane poreuse permettant un remplissage contrôlé et un maintien de la matrice en culture, l'application d'un flux interstitiel s'effectue *via* un phénomène de cavité entraînée bien connu en mécanique des fluides, enfin, la géométrie permet un criblage à haut débit [211]. Pour finir, l'impossibilité de récupérer les cellules une fois en culture dans le système nous empêche de mettre en œuvre l'ensemble des techniques d'analyses biologiques. Nous devons nous restreindre à des analyses semi quantitatives par microscopie à fluorescence qui présentent les inconvénients de dépendre de la qualité et de la spécificité des anticorps, de l'appréciation subjective du degré de fluorescence et du photo-blanchiment. Ceci constitue un frein supplémentaire mais est commun à une grande partie des systèmes microfluidiques.

Au cours de sa thèse [212], Mathieu Danoy a pu mettre en avant la complexité du remplissage d'un dispositif similaire et du maintien de la MEC durant la culture. En testant différents hydrogels, certains phénomènes ont pu être observés comme une rétractation de la matrice après gélification, ou des fuites qui se produisaient dans les canaux adjacents pendant le remplissage ou après la gélification. Durant nos expériences, l'évasement du canal central a permis de résoudre les problèmes liés aux fuites pour l'ensemble des matrices testées et aucune rétractation des gels n'a été observée. Le point critique a été le maintien de la culture. En effet, bien que la perfusion continue supporte généralement des niveaux élevés de survie cellulaire à long terme, l'utilisation d'hydrogels peut être un problème en raison de la dégradation, sous l'action des écoulements, de la matrice [169]. Nous avons ainsi mis au point une association de BIOMIMESYS® *Oncology* et de collagène I répondant à ce point. Notre matrice contient du HA et du collagène I qui sont caractéristiques de la MEC du PDAC [41], [213]. Cette solution permet en plus l'activation des PSC contrairement au Matrigel™ qui induit un état quiescent et un changement de morphologie des PSC [214].

La caractérisation des lignées nous a permis de confirmer le phénotype et l'expression des protéines d'intérêt dans les lignées cellulaires de PDAC [215]–[219], ainsi que dans les PSC [198], [220]. Nous validons l'expression des marqueurs de différenciation/activation des PS-1 ( $\alpha$ -SMA et sécrétion de fibronectine), et des

marqueurs épithéliaux (E-Cadhérine) et mésenchymateux (vimentine) des cellules tumorales. Pour la suite de l'étude, la lignée la plus pertinente pour notre modèle est la lignée **Capan-2** car elle exprime l'E-Cadhérine de façon membranaire et n'exprime pas la vimentine, ceci nous permettra de visualiser une éventuelle TEM lors de la co-culture avec les PS-1 et sous chimiothérapie (Chapitre 3) [221], [222]. Au cours de la TEM, la diminution de l'E-Cadhérine est associée à un changement de localisation de son expression, la localisation membranaire devient cytoplasmique. En parallèle, nous avons pu valider la spécificité des anticorps et le protocole d'immunomarquage (voir matériel et méthodes, partie V page 137).

Notre modèle permet l'application d'un flux interstitiel à travers le canal central qui exerce ainsi une pression hydrostatique sur les cellules. Bien que cette pression ne soit pas entièrement due aux flux mais aussi aux tissus environnants, il serait intéressant de pouvoir l'évaluer. Pour cela il existe des capteurs de pression électrofluidique qui peuvent être introduits dans le système et permettre cette mesure [223]. La pression exercée par les tissus environnants peut être mimée en ajoutant un étage au dispositif actuel. Cet étage contenant un fluide (air, eau, huile etc.) nous permettrait d'appliquer une pression contrôlée sur l'étage de culture *via* une fine membrane. Cette méthode est déjà utilisée pour faire des valves microfluidiques et pourrait être adaptée en appliquant une pression pertinente simulant les interactions avec les tissus adjacents [224].

Concernant le modèle de convection-diffusion, nous n'avons pas de point de comparaison car chaque dispositif est conçu différemment pour répondre à une problématique précise. Qui plus est, nous utilisons de la fluorescéine tandis que la majorité des études s'intéressant à la diffusion de molécule dans des hydrogels utilise du Dextran [180], [209], [211]. Ce dernier est globalement utilisé pour analyser la répartition des composés chimiques et non la vitesse à laquelle ils diffusent. Il n'est, de surcroît, pas adapté pour l'étude de petites molécules comme le glucose, l'oxygène ou les chimiothérapies et possède un coefficient de diffusion différent de la fluorescéine [225], [226]. En revanche, il existe différentes masses moléculaires de Dextran, pouvant varier de 4,4 à 500 kDa<sup>10</sup>, ce qui le rend plus pertinent pour l'étude de la diffusion des facteurs sécrétés comme le TGF- $\beta$  (Tableau 4). La fluorescéine est quant à elle, plutôt utilisée pour analyser la vitesse de diffusion des molécules en

---

<sup>10</sup> 1 Da = 1 g/mol

microscopie à fluorescence, couplée ou non avec une méthode de mesure « *fluorescence recovery after photobleaching* » (FRAP) [180], [227]. Sa masse moléculaire correspond à celles des chimiothérapies mais reste supérieure à celles des petites molécules comme le glucose ou l'oxygène (Tableau 4). Nous observons donc une sous-estimation du transport de masse de ces molécules.

Tableau 4. Masse moléculaire des molécules d'intérêt pour l'étude de la diffusion

	Fluore-scéine	Glucose	Oxygène	OXA	SN-38	5-FU	TGF- $\beta$
<b>Masse moléculaire (g/mol)</b>	332,31	180,156	15,999	397,2858	392,404	130,08	44 341

Le modèle et les paramètres choisis nous permettent d'obtenir une vitesse du liquide interstitiel de 2,5  $\mu\text{m/s}$ , ce qui est validé par les observations faites *in vivo* et les modélisations des précédentes études [146], [147], [180]. Nous validons par la même occasion le modèle numérique développé par Lucie Dercourt au cours de son M1.

Bien que nous démontrons la génération d'un gradient, celui-ci est largement supérieur à 1 mm et ne reproduit donc pas les conditions caractéristiques d'une tumeur pancréatique observées *in vivo*, notamment sa forte hypoxie et son hypoperfusion. En effet, différents cas peuvent être possibles en fonction du type de transport (convection ou diffusion) et de la cinétique de consommation, non prise en compte dans notre modèle. Une étude a démontré que la concentration en chimiothérapie (Doxorubicine) diminue de moitié par rapport à sa concentration périvasculaire à une distance d'environ 40 à 50  $\mu\text{m}$  [228]. L'oxygénation tissulaire affecte fortement les réponses tumorales aux chimiothérapies or la distance de diffusion maximale de l'oxygène depuis les vaisseaux sanguins est d'environ 100  $\mu\text{m}$ . Au-delà de cette distance le tissu tumoral devient hypoxique [229], [230]. Enfin, la distance à laquelle la nécrose des cellules non alimentées par les vaisseaux sanguins se produit a été évaluée à 150  $\mu\text{m}$  [231]. Il serait intéressant d'intégrer une vascularisation plus pertinente comme dans le dispositif développé par Shirure *et al.* en 2018 [192].

La limite de ce modèle expérimental de convection-diffusion est de ne pas prendre en compte la consommation des cellules. La distance à laquelle un soluté peut être transporté dans le tissu par diffusion ou convection est limitée par la vitesse à laquelle il est absorbé par les composants tissulaires. Il existe actuellement différentes

méthodes pour analyser cette consommation, certaines restent difficiles à mettre en œuvre sur un système microfluidique car elles nécessitent l'adaptation complète des systèmes de mesures actuels, par exemple pour le SeaHorse XF24 Analyzer, ou encore l'accès direct aux cellules avec l'utilisation d'un microscope électrochimique à balayage [232], [233]. Cependant des alternatives semblent possibles avec l'utilisation de marqueurs fluorescents réagissant avec les molécules consommées [234]–[236]. Cette dernière méthode requiert toutefois une analyse par cytométrie en flux et donc de pouvoir récupérer les cellules, ce qui n'est actuellement pas réalisé dans notre système. Des études sont en cours afin de développer des méthodes permettant de mesurer/détecter une plage de conditions biochimiques (glucose, lactate, oxygène, pH) dans les systèmes de culture [237].

Hormis le transport d'oxygène et de glucose, nous souhaitons étudier les interactions tumeur-stroma. Pour cela, il est nécessaire que le flux imposé permette la diffusion des molécules sécrétées entre les cellules et n'en emporte pas l'intégralité, tout en ne dégradant pas la MEC. Il a été montré que les facteurs sécrétés par une tumeur pouvaient diffuser dans le sens inverse du flux. Ce phénomène dépend du nombre de Peclet qui est le rapport du transfert de masse par convection sur le transfert par diffusion :

$$Pe = \frac{ud}{D_i}$$

Avec  $u$  la vitesse d'écoulement du milieu,  $d$  la longueur caractéristique de l'écoulement et  $D_i$  le coefficient de diffusion du réactif  $i$ . Les nombres de Peclet relevant physiologiquement ont été rapportés comme variant de 0,1 à 10 [238], [239]. Dans notre étude, pour une molécule comme le TGF- $\beta$ ,  $D_{TGF-\beta} = 2,6 \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$ , en admettant que la distance entre les cellules dans le dispositif est inférieure à 50  $\mu\text{m}$ , nous obtenons un nombre de Peclet :  $Pe \sim 5$ , ce qui permet une communication entre elles. Cette valeur démontre que la convection est plus importante que la diffusion, validant ainsi notre modèle expérimental.

Finalement, les paramètres et les conditions de culture de notre modèle *in vitro* 3D microfluidique font de notre système un modèle d'étude innovant et actuellement non référencé dans la littérature.



## Chapitre 3 : Résultats : Etude des interactions tumeur-stroma et de la chimiorésistance du PDAC

### I. Objectifs

Malgré une efficacité accrue en termes de survie par rapport aux autres traitements utilisés en clinique (voir chapitre 1), la chimiorésistance liée au protocole FOLFIRINOX n'a pas été décrite dans la littérature. Le protocole comprenant plusieurs agents thérapeutiques, sa modélisation est donc complexe et a pu être mise de côté en faveur d'autres modèles. Les études actuelles sont majoritairement portées sur les mécanismes de résistance à la gemcitabine bien que celle-ci ne soit qu'une alternative en cas d'échec ou d'impossibilité de traitement par FOLFIRINOX.

Les problématiques sont les suivantes : Comment modéliser le protocole FOLFIRINOX dans notre modèle d'étude *in vitro* 3D et microfluidique ? Est-ce que les mécanismes jouant un rôle majeur dans la chimiorésistance à la gemcitabine, comme la TEM et les interactions tumeur-stroma, jouent aussi un rôle dans la chimiorésistance au FOLFIRINOX ?

### II. Conditions de culture

Suite aux résultats obtenus dans le chapitre 2, nous avons défini 4 conditions de culture pour les études des interactions tumeur-stroma et de la sensibilité aux traitements chimiothérapeutiques (Tableau 5).

Tableau 5. Conditions de culture de notre modèle

Groupe contrôle sans traitement (NT)	Groupe avec traitement (T)
Capan-2 3D statique (S)	Capan-2 3D statique (S)
Capan-2 3D fluidique (F)	Capan-2 3D fluidique (F)
Co-culture Capan-2 : PS-1 3D statique (S)	Co-culture Capan-2 : PS-1 3D statique (S)
Co-culture Capan-2 : PS-1 3D fluidique (F)	Co-culture Capan-2 : PS-1 3D fluidique (F)

La culture statique est exactement la même que celle en fluidique, dans un dispositif avec la même matrice, sauf que le milieu de culture et la chimiothérapie ne sont pas appliqués par perfusion dynamique. Le milieu de culture est changé tous les 2 jours tandis que la chimiothérapie est appliquée en une fois comme dans les cultures 3D

classiques. Ceci permettra d'avoir les mêmes conditions environnementales, avec le PDMS et la lame de verre notamment, et ainsi éviter d'induire des erreurs dans nos interprétations.

Pour rappel, les paramètres de culture de notre modèle *in vitro* 3D microfluidique sont les suivants :

- Le flux appliqué dans le canal supérieur est fixé à 100  $\mu\text{m/s}$  générant un flux interstitiel de 2,5  $\mu\text{m/s}$  dans le canal central.
- La matrice extracellulaire utilisée est une association de BIOMIMESYS® *Oncology* et de collagène I à une concentration de 2 mg/ml, la densité cellulaire est fixée à  $2 \times 10^6$  de cellules/ml de collagène en mono et co-culture.
- Le ratio Capan-2 : PS-1 utilisé pour la co-culture est de 1:3 [71], [179]

### III. Modélisation du protocole FOLFIRINOX

#### 1. Le protocole clinique

Le protocole FOLFIRINOX, actuellement utilisé en clinique, comprend une perfusion d'oxaliplatine pendant 2 h suivie d'une perfusion de 2 h d'acide folinique, une perfusion d'irinotécan de 90 minutes est ensuite démarrée en Y 30 min après le début de la perfusion d'acide folinique, enfin un bolus de 5-FU puis une perfusion continue de 5-FU sur 46 h sont réalisés. Le traitement est répété tous les 14 jours (Thésaurus National de Cancérologie Digestive - Chapitre 9 : Cancer du pancréas - 27/06/2018).

L'oxaliplatine est un agent alkylant dérivé de platine aux propriétés antitumorales, comme le cisplatine, inhibant la synthèse et la réplication de l'ADN. L'acide folinique est utilisé pour diminuer la très forte cytotoxicité du protocole FOLFIRINOX et améliorer l'effet de certaines drogues comme le 5-FU. Le 5-FU est un analogue de nucléotides inhibant la thymidylate synthase essentielle à la réplication de l'ADN. Il peut également être métabolisé en uracile triphosphate fluoré (5-FUTP) afin de s'incorporer dans les ARNm, conduisant au blocage et à la dégradation de ceux-ci, perturbant ainsi leur traduction en protéines. Il est à noter que la gemcitabine est aussi un dérivé de nucléoside bloquant la synthèse de l'ADN.

Enfin, l'irinotécan est un inhibiteur de topoisomérase. Son métabolite actif, le SN-38, est produit dans le foie. Le SN-38 inhibe la topoisomérase 1 provoquant des cassures double brin irréversibles lors de la réplication et la transcription de l'ADN ce qui conduit à la mort cellulaire [240].

## **2. Modélisation in vitro du protocole**

Ces travaux ont été réalisés avec l'aide de **Charles Poiraud** interne en chirurgie digestive et étudiant en M2 recherche dans l'équipe Mucines du laboratoire CANTHER sur la mise en place d'un modèle in vitro d'acquisition de la résistance au FOLFIRINOX du PDAC.

L'objectif ici est de déterminer les concentrations de l'association des trois drogues du protocole FOLFIRINOX afin de modéliser au mieux les conditions physiologiques.

Pour répondre à cette question, nous avons estimé les concentrations tissulaires moyennes à partir des courbes de concentration plasmatique des trois drogues du protocole FOLFIRINOX en se basant sur une méta-analyse pharmacocinétique [241]. Le mode de distribution des drogues est « bi compartimental », c'est-à-dire qu'une fois dans le système vasculaire, les drogues diffusent dans les tissus, dans un premier temps en faisant augmenter la concentration tissulaire, puis, lorsque la concentration plasmatique s'équilibre avec la concentration tissulaire, le sens de diffusion s'inverse et il s'en suit une phase d'élimination pure des deux compartiments faisant diminuer les concentrations plasmatiques et tissulaires jusqu'à l'élimination complète (Figure 24). L'estimation est calculée lorsque la concentration tissulaire est maximale, c'est-à-dire lorsque la concentration plasmatique s'équilibre avec la concentration tissulaire. Ceci s'observe graphiquement par un changement de pente (Figure 24). Par contre, si la perfusion est continue, comme pour le 5-FU, les concentrations plasmatiques et tissulaires sont en permanence à l'équilibre. Il n'y aura donc pas de changement de pente. En utilisant ce principe, nous avons donc pu estimer la concentration tissulaire physiologique de référence pour chaque drogue :

- 5-FU : 4  $\mu$ M
- Oxaliplatine : 0,5  $\mu$ M
- SN-38 : 12,5 nM

On notera que les rapports entre les concentrations calculées sont les suivants :

**1 SN-38 : 40 OXA : 320 5-FU**

Ces ratios peuvent paraître aberrants au premier abord, mais nous parlons ici du SN-38 et non de l'irinotécan. Lorsque ce dernier est métabolisé par le foie, seulement 2 à 5 % sont convertis en SN-38 [242]. En fonction de l'irinotécan, si 5% de SN-38 sont métabolisés, les ratios seraient alors respectivement : **1 IRI : 2 OXA : 16 5-FU**. Ceci

est alors très proche du ratio 1 : 2 : 20 utilisé en clinique [243]. Ces résultats valident donc l'approche faites dans notre étude.

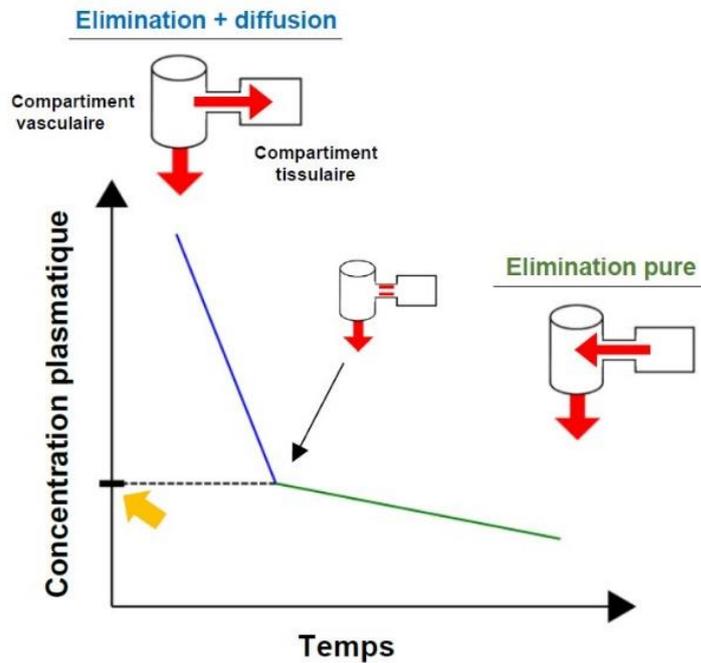


Figure 24. Modélisation de la distribution bi-compartmentale. La courbe est répartie en deux phases distinctes : la première correspond à une phase d'élimination associée à une diffusion vers les tissus (en bleu), la deuxième phase correspond à l'élimination pure (en vert). Le point où la courbe change de pente est une estimation de la concentration tissulaire maximale (flèche orange) (image de Charles Poiraud).

Nous avons ensuite modélisé le protocole FOLFIRINOX dans notre modèle d'étude *in vitro* 3D microfluidique (Figure 25). Ce modèle nous permet de mimer la dynamique du protocole clinique (bolus, perfusions) ainsi que la distribution bi-compartmentale observée *in vivo*. En effet, l'apport automatisé et contrôlé de la chimiothérapie *via* les microcanaux permet de modéliser la diffusion dans les tissus et l'élimination des drogues par les cellules. Ceci est un réel avantage par rapport aux modèles de culture 2D et 3D classiques. La durée de notre protocole est d'une semaine, les quatre premiers jours (96 h) permettant la mise en place de la culture, de l'ensemencement et de la prolifération cellulaire, puis l'injection des drogues qui se fait en deux temps : un bolus (OXA, SN-38 et 5-FU) suivi d'une perfusion continue de 5-FU durant 72 h. Une fois le protocole terminé, les dispositifs sont analysés par imagerie à fluorescence afin de déterminer la viabilité cellulaire et l'expression des protéines d'intérêt.

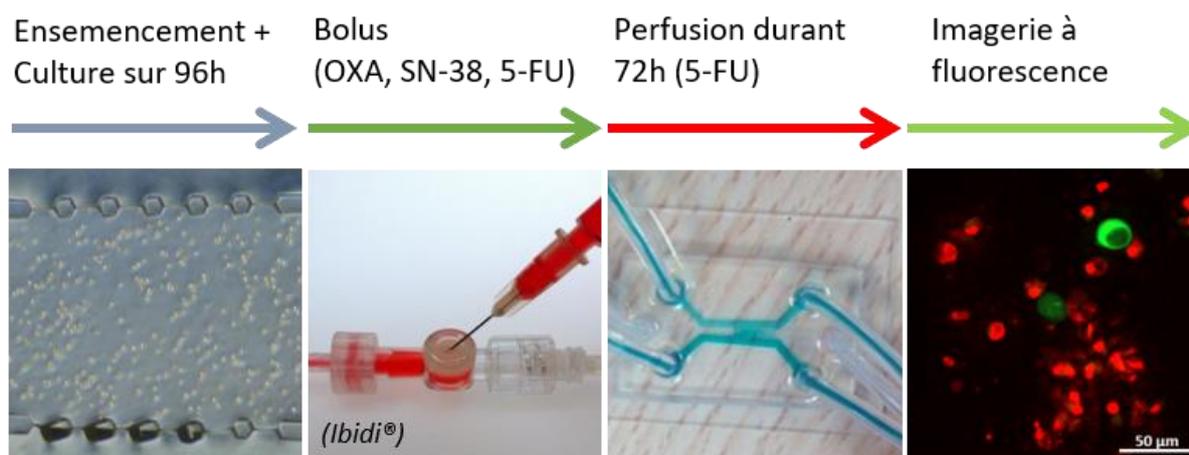


Figure 25. Modélisation du protocole FOLFIRINOX dans notre modèle *in vitro* 3D microfluidique contenant BIOMIMESYS® Oncology + collagène I.

#### IV. Etude de la viabilité cellulaire sous traitement FOLFIRINOX

L'étude de la viabilité cellulaire a été réalisée en suivant le protocole décrit précédemment. La quantification de la viabilité cellulaire pour chaque dose a été réalisée par test au sel de tétrazolium (MTT) en 2D et par test Live/Dead pour les autres conditions. Ce test consiste à marquer les cellules vivantes avec de la Calcéine AM et les cellules mortes avec l'homodimère-1 d'éthidium (EthD-1), voir les protocoles en annexe (matériel et méthodes, partie IV page 136).

La gamme des doses injectées dans notre modèle est calculée en faisant varier, par puissance de 10, la dose de référence calculée *in vivo* (Tableau 6).

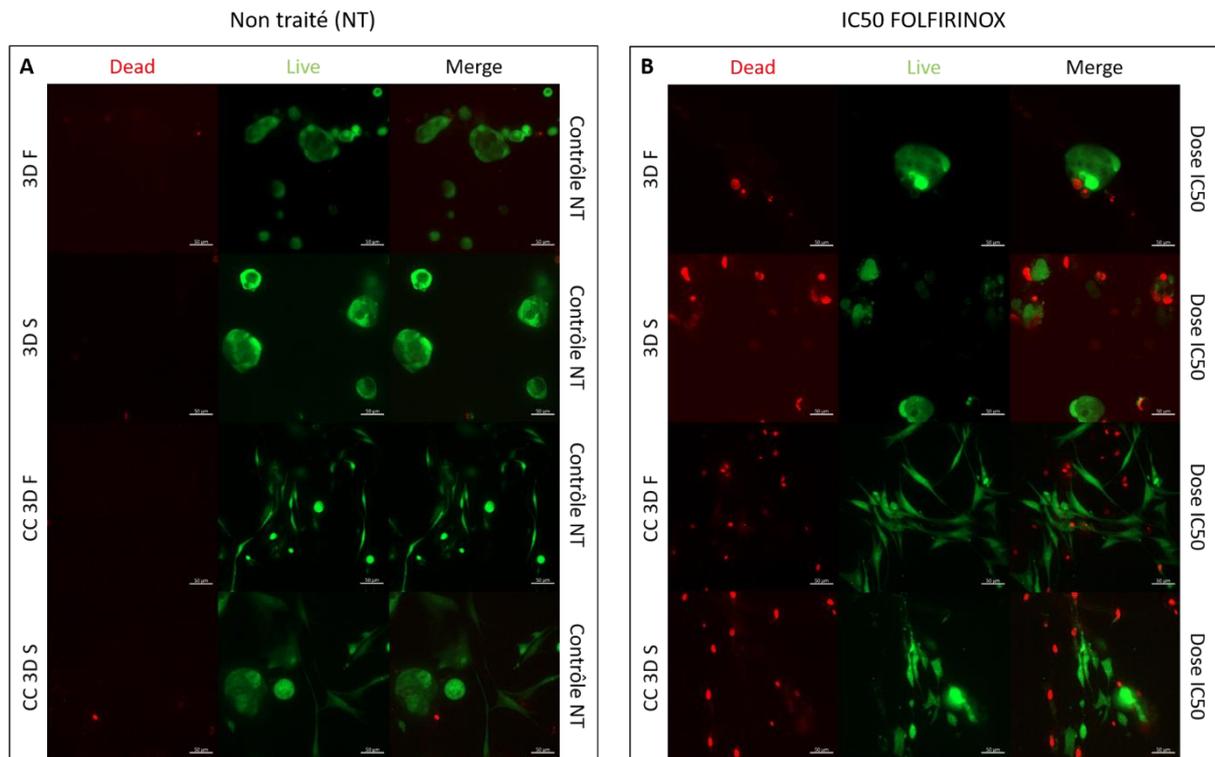
Tableau 6. Doses des drogues associées du protocole FOLFIRINOX. La dose 1 étant la condition contrôle non traitée et la dose 5 la référence calculée *in vivo*.

	Dose 1	Dose 2	Dose 3	Dose 4	Dose 5	Dose 6	Dose 7	Dose 8
<b>5-FU</b>	0	4 nM	40 nM	0,4 µM	4 µM	40 µM	0,4 mM	4 mM
<b>OXA</b>	0	0,5 nM	5 nM	50 nM	0,5 µM	5 µM	50 µM	0,5 mM
<b>SN-38</b>	0	12,5 pM	125 pM	1,25 nM	12,5 nM	125 nM	1,25 µM	12,5 µM

Suite aux tests Live/Dead effectués (Figure 26), nous pouvons observer un changement de morphologie des PS-1 à la dose IC<sub>50</sub>, concentration requise pour inhiber 50 % de la viabilité cellulaire. En effet, sans traitement les PS-1 sont très allongées et fusiformes alors qu'une fois sous traitement, nous constatons qu'elles sont plus grosses. Ce marquage ne nous permet pas d'observer de changement

morphologique des Capan-2. Enfin, il n'y a pas de différence notable entre la condition statique et la condition fluïdique au niveau morphologique.

En mono-culture, nous pouvons observer que seuls les plus gros sphéroïdes formés par les Capan-2 ont survécu aux traitements. Tandis que dans les co-cultures, il semblerait que la mortalité des PS-1 soit supérieure à celle des Capan-2, même pour les plus petits sphéroïdes.



**Figure 26.** Etude de la viabilité cellulaire dans le modèle 3D microfluidique. A) Sans traitement (NT). B) Dose  $IC_{50}$  du protocole FOLFIRINOX. Cellules Capan-2 en monoculture et co-culture (CC) avec des PS-1. Marquage des cellules vivantes en vert avec de la Calcein AM (Live) et des cellules mortes en rouge avec du EthD-1 (Dead). 3D : culture dans un dispositif microfluidique contenant BIOMIMESYS® *Oncology* + collagène I. S : Statique, F : Fluidique. Imagerie confocale : échelle 50  $\mu$ m.

Ces tests nous ont permis de tracer les courbes de viabilité et de calculer l' $IC_{50}$  pour chaque condition testée (Figure 27 et Tableau 7). Les résultats obtenus sur les cultures 2D montrent que les PS-1 sont plus sensibles au traitement que les Capan-2 avec un  $IC_{50}$  6 fois plus petit. Ce résultat va dans le sens des observations faites en co-culture dans notre système microfluidique (Figure 26).

En ce qui concerne les résultats obtenus avec le modèle 3D microfluidique, nous observons une augmentation significative de l' $IC_{50}$  par rapport à la culture 2D classique des Capan-2. Nous obtenons respectivement des valeurs 1,4 et 12,1 fois plus élevées pour la mono-culture statique et fluïdique, ainsi que 1,36 et 5,3 fois plus élevées pour la co-culture statique et fluïdique.

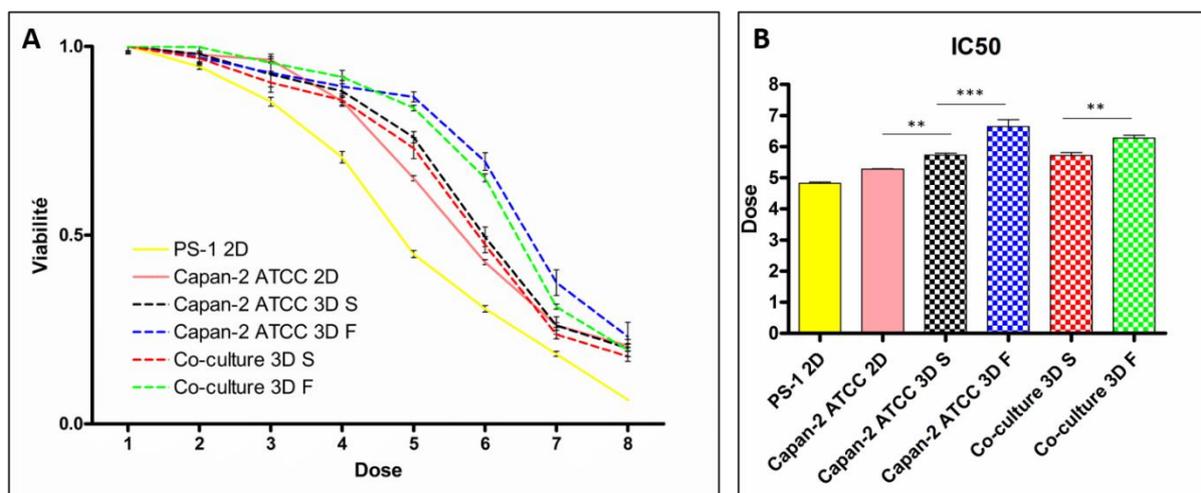


Figure 27. Etude de la viabilité cellulaire sous traitement FOLFIRINOX. A) courbe de survie des différentes conditions de cultures. B) IC<sub>50</sub> des différentes conditions calculées par régression non linéaire avec GraphPad. 3D : culture dans un dispositif microfluidique contenant BIOMIMESYS® Oncology + collagène I, S : Statique, F : Fluidique. n=3, moyenne + écart type. P < 0.01 (\*\*) et P < 0.001 (\*\*\*).

Finalement, ces résultats montrent que suivant le modèle proposé et sa pertinence physiologique, l'IC<sub>50</sub> évolue de manière différente traduisant ainsi une chimiorésistance accrue des modèles 3D microfluidiques en comparaison aux cultures 2D et 3D classiques. Il est donc important de prendre en compte les PSC, la MEC et le flux interstitiel pour développer un modèle d'étude *in vitro* plus proche de la réalité *in vivo* du PDAC.

Tableau 7. IC<sub>50</sub> des différentes conditions calculées par régression non linéaire avec GraphPad. Concentration des drogues associées à la dose IC<sub>50</sub>. 2D : monoculture classique sur plaque 3D : culture dans un dispositif microfluidique contenant BIOMIMESYS® Oncology et du collagène I (2 mg/ml), S : Statique, F : Fluidique.

	PS-1 2D	Capan-2 2D	Capan-2 3D S	Capan-2 3D F	Co-culture 3D S	Co-culture 3D F
<b>Dose IC<sub>50</sub></b>	4,82	5,28	5,73	6,64	5,72	6,28
<b>5-FU</b>	3,28 μM	21,12 μM	29,2 μM	256 μM	28,8 μM	112 μM
<b>OXA</b>	0,41 μM	2,64 μM	3,65 μM	32 μM	3,6 μM	14 μM
<b>SN-38</b>	10,25 nM	66 nM	91,25 nM	0,8 μM	90 nM	0,35 μM

## V. Etude de l'expression des marqueurs d'intérêt sous traitement avec le protocole FOLFIRINOX

Dans cette partie, nous avons traité les différentes conditions de culture à leur dose  $IC_{50}$  correspondante. Ensuite, afin d'étudier l'effet du FOLFIRINOX sur les marqueurs d'intérêt, nous avons réalisé des immunomarquages fluorescents qui nous ont permis de quantifier l'expression de chaque protéine.

La première observation valable pour l'ensemble des résultats est que la condition fluïdique influe indirectement sur l'expression des protéines sélectionnées. Il est important de dire indirectement car les valeurs d' $IC_{50}$  dépendent de la condition fluïdique, et de préciser que l'expression associée à cette dose elle, ne varie pas en fonction des conditions. Nous avons donc des expressions quasi-identiques entre les conditions statiques et fluïdiques. Afin de visualiser un effet du flux, il faudrait traiter toutes les conditions avec une dose identique mais nous n'aurions alors pas les mêmes effets en raison d'un stress différent lié à la chimiothérapie.

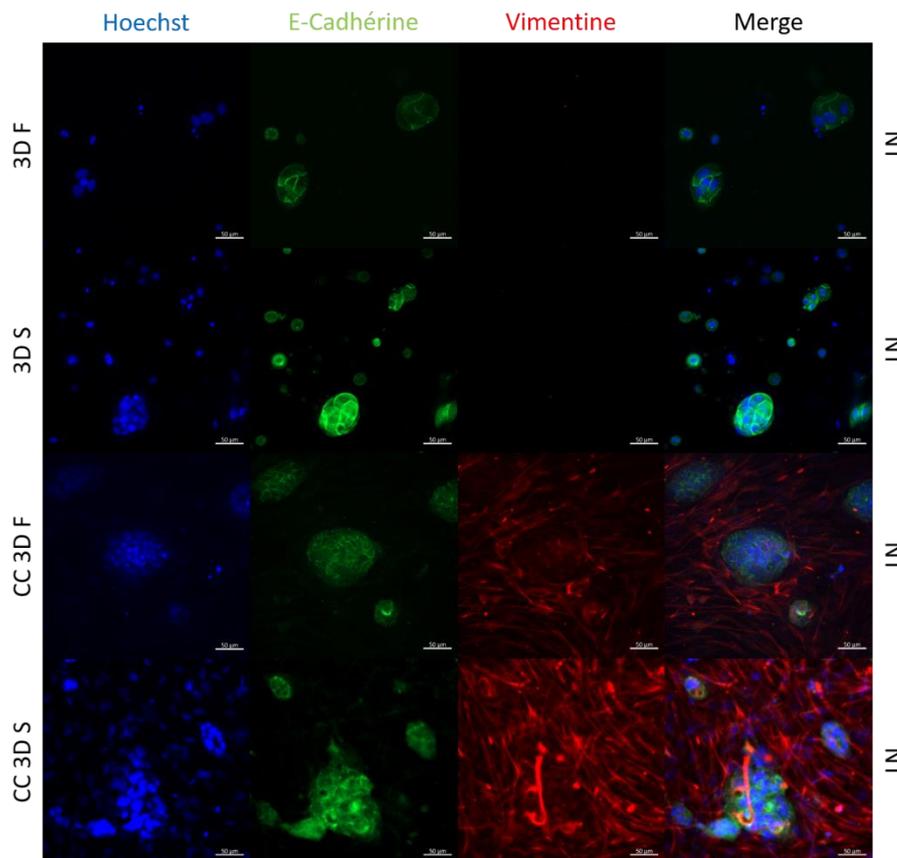


Figure 28. Etude de l'expression de l'E-Cadhérine et la vimentine, sans traitement (NT), des cellules Capan-2 en monoculture et co-culture (CC) avec des PS-1 cultivées dans un dispositif microfluidique contenant BIOMIMESYS® Oncology + collagène I. Dilution des anticorps primaires 1/100 et 1/200 pour les secondaires. Co-marquage avec le Hoechst (noyau). S : Statique, F : Fluidique. Imagerie confocale : échelle 50 µm.

Nous observons une diminution et un changement de localisation de l'expression de l'E-Cadhérine dans les Capan-2. En culture 3D, S et F non traité, l'E-Cadhérine est fortement exprimée de manière membranaire. Une fois en co-culture avec les PS-1, son expression reste importante mais la localisation est plutôt cytoplasmique. Ces observations s'accroissent sous traitement. En effet, en mono-culture son expression est faible et entièrement cytoplasmique puis disparaît quasiment en co-culture (Figures 28, 29 et 31). Parallèlement, l'expression de la vimentine, non présente initialement dans les Capan-2, apparaît une fois en co-culture avec les PSC (Figures 30 et 32). Sous traitement, les résultats obtenus vont dans le sens inverse de l'expression de l'E-Cadhérine, c'est dire que nous observons une expression importante de la vimentine en mono-culture et de manière encore plus accrue en co-culture (Figure 30 et 32).

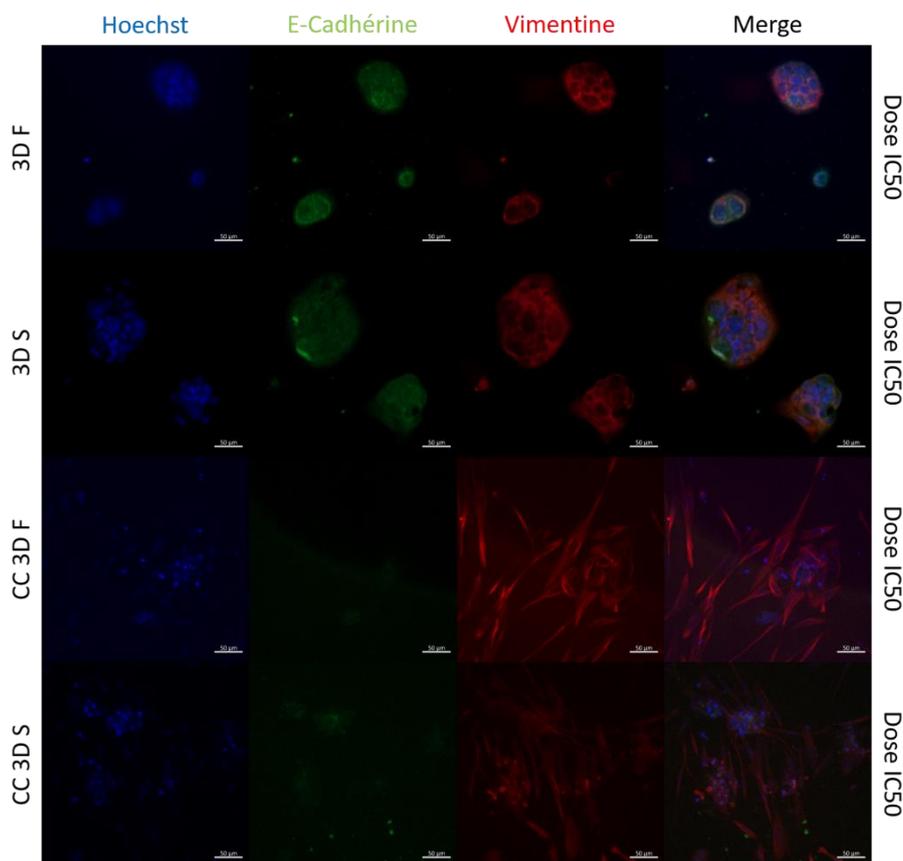


Figure 29. Etude de l'expression de l'E-Cadhérine et la vimentine, à la dose IC<sub>50</sub> du protocole FOLFIRINOX, des cellules Capan-2 en monoculture et co-culture (CC) avec des PS-1 cultivées dans un dispositif microfluidique contenant BIOMIMESYS® Oncology + collagène I. Dilution des anticorps primaires 1/100 et 1/200 pour les secondaires. Co-marquage avec le Hoechst (noyau). S : Statique, F : Fluidique. Imagerie confocale : échelle 50 µm.

Les observations des résultats sans traitement montrent la promotion possible d'un phénotype dédifférencié des Capan-2 par les PS-1 en co-culture avec la néo expression de la vimentine, tandis que les résultats suite au traitement indiquent l'induction d'un phénomène de type TEM par le FOLFIRINOX.

Pour les PS-1, nous observons une diminution de l'expression de la vimentine (-50%), de la fibronectine (-50%) et l' $\alpha$ -SMA (-25%) après traitement (Figures 29, 30 et 32). Nous remarquons que la fibronectine est sécrétée de manière très diffuse dans l'intégralité de la matrice sans traitement, alors qu'elle est localisée de manière plus intense autour des PS-1 et des amas tumoraux, agissant comme une barrière protectrice sous FOLFIRINOX (Figure 31).

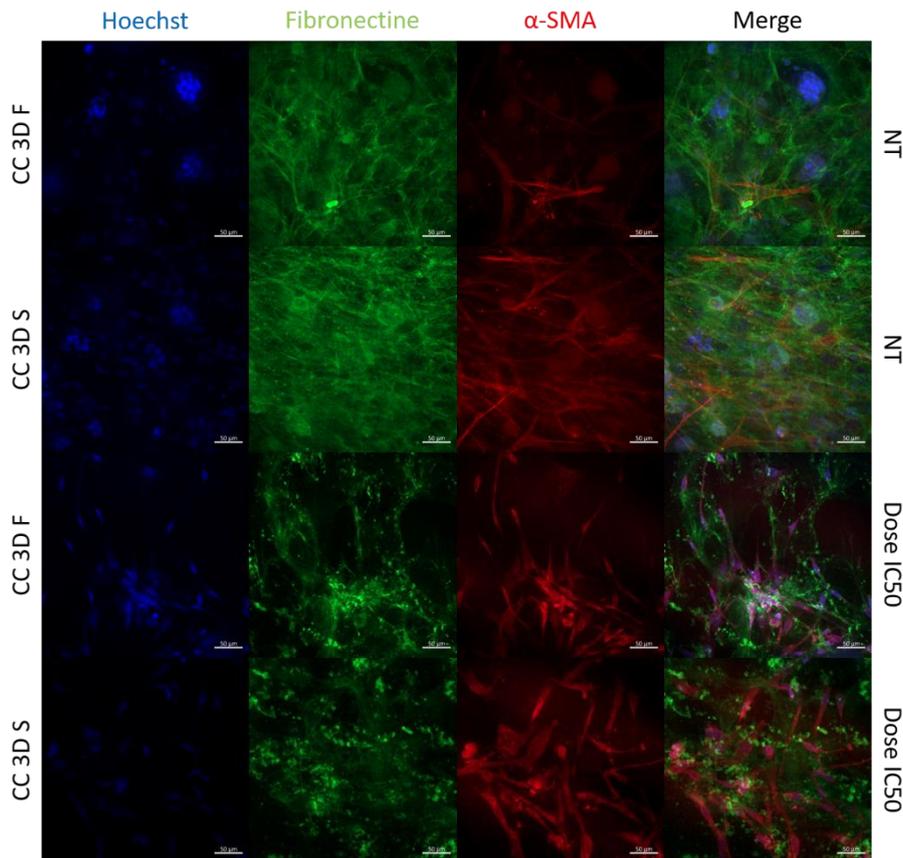


Figure 30. Etude de l'expression de la fibronectine et l' $\alpha$ -SMA, sans traitement (NT) et à la dose  $IC_{50}$  du protocole FOLFIRINOX, des cellules PS-1 en co-culture (CC) avec des Capan-2 cultivées dans un dispositif microfluidique contenant BIOMIMESYS® *Oncology* + collagène I. Dilution des anticorps primaires 1/100 et 1/200 pour les secondaires. Co-marquage avec le Hoechst (noyau). S : Statique, F : Fluidique. Imagerie confocale : échelle 50  $\mu$ m.

Toutefois, les expressions de ces marqueurs étant normalisées par rapport à l'expression du noyau (marquage Hoechst) ces résultats sont à interpréter avec précaution car nous observons une augmentation de la taille des noyaux sous traitement. En effet, nous mettons en évidence un changement de morphologie des PS-1 sous traitement. Celles-ci sont moins allongées, plus grosses et avec un gros noyau. Ceci est un signe de souffrance cellulaire. Nous avons quantifié cette observation en calculant le facteur de circularité défini par :

$$f = \frac{4 \times \pi \times \text{aire de la cellule}}{(\text{périmètre de la cellule})^2}$$

Si ce rapport équivaut à 1, alors la cellule est parfaitement ronde, tandis que si on

approche de 0 elle est très allongée. Nous passons ici de 0,11 sans traitement à 0,31 avec (Figure 33). Cette observation pourrait être due à de la sénescence ou à de l'apoptose provoquée par le traitement [244], [245].

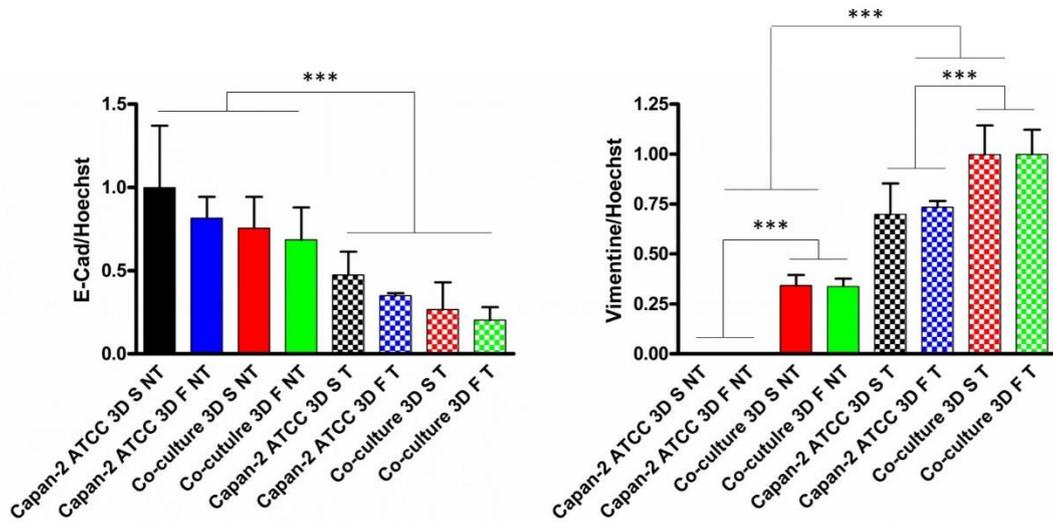


Figure 31. Analyse de l'expression de l'E-Cadhérine et la vimentine dans les cellules Capan-2, à la dose  $IC_{50}$  (T) du protocole FOLFIRINOX, en monoculture et co-culture avec des PS-1 cultivées dans un dispositif microfluidique contenant BIOMIMESYS® *Oncology* et du collagène I (2 mg/ml). Résultats normalisés par rapport à l'ADN en utilisant le signal du Hoechst. S : Statique, F : Fluidique. n=3, moyenne + écart type. P < 0.01 (\*\*) et P < 0.001 (\*\*\*).

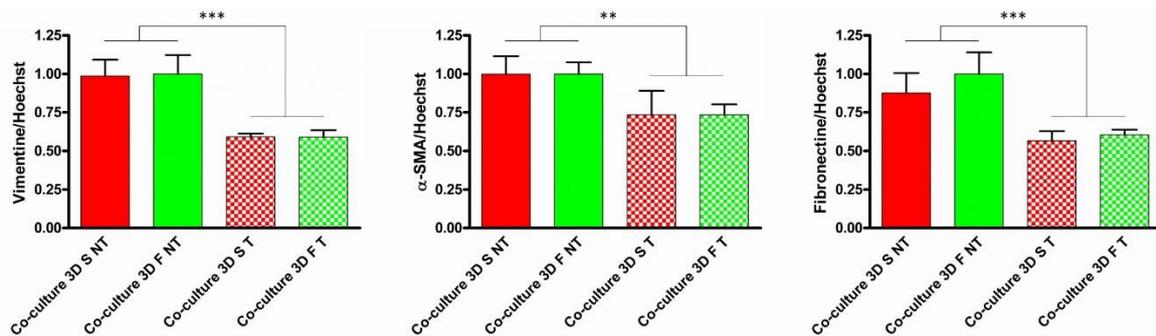


Figure 32. Analyse de l'expression de la vimentine, l' $\alpha$ -SMA et la fibronectine dans les cellules PS-1, à la dose  $IC_{50}$  (T) du protocole FOLFIRINOX, en co-culture avec des Capan-2 cultivées dans un dispositif microfluidique contenant BIOMIMESYS® *Oncology* et du collagène I (2 mg/ml). Résultats normalisés par rapport à l'ADN en utilisant le signal du Hoechst. S : Statique, F : Fluidique. n=3, moyenne + écart type. P < 0.01 (\*\*) et P < 0.001 (\*\*\*).

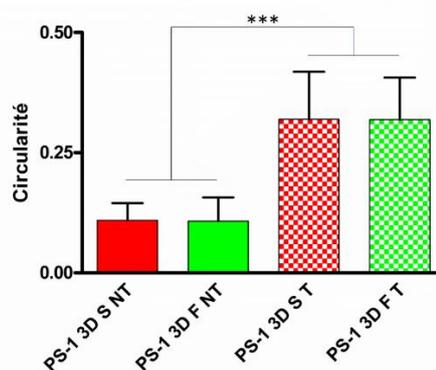


Figure 33. Analyse de la circularité des cellules PS-1, à la dose  $IC_{50}$  (T) du protocole FOLFIRINOX, en co-culture avec des Capan-2 cultivées dans un dispositif microfluidique contenant BIOMIMESYS® *Oncology* et du collagène I (2 mg/ml). S : Statique, F : Fluidique. n=3, moyenne + écart type. P < 0.001 (\*\*\*).

## VI. Discussion

Dans cette deuxième partie de nos travaux, nous avons montré l'apport de notre modèle de culture 3D *in vitro* microfluidique à l'étude de la chimiorésistance du PDAC vis-à-vis du protocole FOLFIRINOX et des interactions tumeur-stroma. Cette étude fait ressortir l'importance des paramètres physiologiques suivants :

- La culture 3D et microfluidique permettant la modélisation de la cinétique d'un protocole multidrogues complexe et ayant un effet sur la réponse des cellules à ces mêmes drogues.
- La co-culture cellules tumorales avec des PSC qui influe sur l'IC<sub>50</sub> et la TEM.

Il existe plusieurs points sensibles concernant la modélisation proposée du protocole FOLFIRINOX dans notre système. Pourquoi effectuer un bolus (OXA, SN-38, 5-FU) alors que ces drogues sont injectées en perfusion continue dans le protocole clinique ? Pourquoi effectuer une perfusion continue de 5-FU durant 72 h contre 46 h dans le protocole clinique ? Quelles sont les limites de l'évaluation graphique des concentrations tissulaires ?

Pour répondre à la première question, en observant les courbes pharmacocinétiques des concentrations des différentes drogues (Figure 34), on constate que la chimiothérapie arrive dans la tumeur sous forme d'un pic de concentration bien que la perfusion soit continue et non sous forme de bolus. Nous avons donc voulu reproduire ce phénomène de pic *via* le bolus appliqué.

Concernant le deuxième point, le protocole clinique de perfusion est en effet appliqué sur 48 h, mais la clairance des molécules des tissus, notamment de l'oxaliplatine et du SN-38, s'effectue au-delà de 72 h. La tumeur est donc en contact avec la chimiothérapie pendant ce temps. Cette observation valide ainsi notre protocole.

Enfin, l'estimation des concentrations par une méthode graphique induit un biais de par sa nature. En effet, l'analyse graphique est source d'erreurs de type observationnel, comme l'appréciation de chacun ou la limitation intrinsèque de la précision de l'échelle de mesure sur les axes. Le biais provient également, d'une part, de l'étude pharmacocinétique servant de référence elle-même, car le nombre de patients participant est très faible, et d'autre part, de la variabilité interindividuelle, car chaque patient métabolise de manière différente les molécules et la concentration mesurée sera alors dépendante du patient [242].

Cependant, la méthode mise en place nous permet d'obtenir une approximation de la concentration moyenne de chacune des drogues du protocole FOLFIRINOX. Qui plus est, les résultats obtenus avec cette modélisation, durant la thèse ou au laboratoire (groupe du Dr Vincent), semblent cohérents avec les observations cliniques et les autres études en cours sur le PDAC.

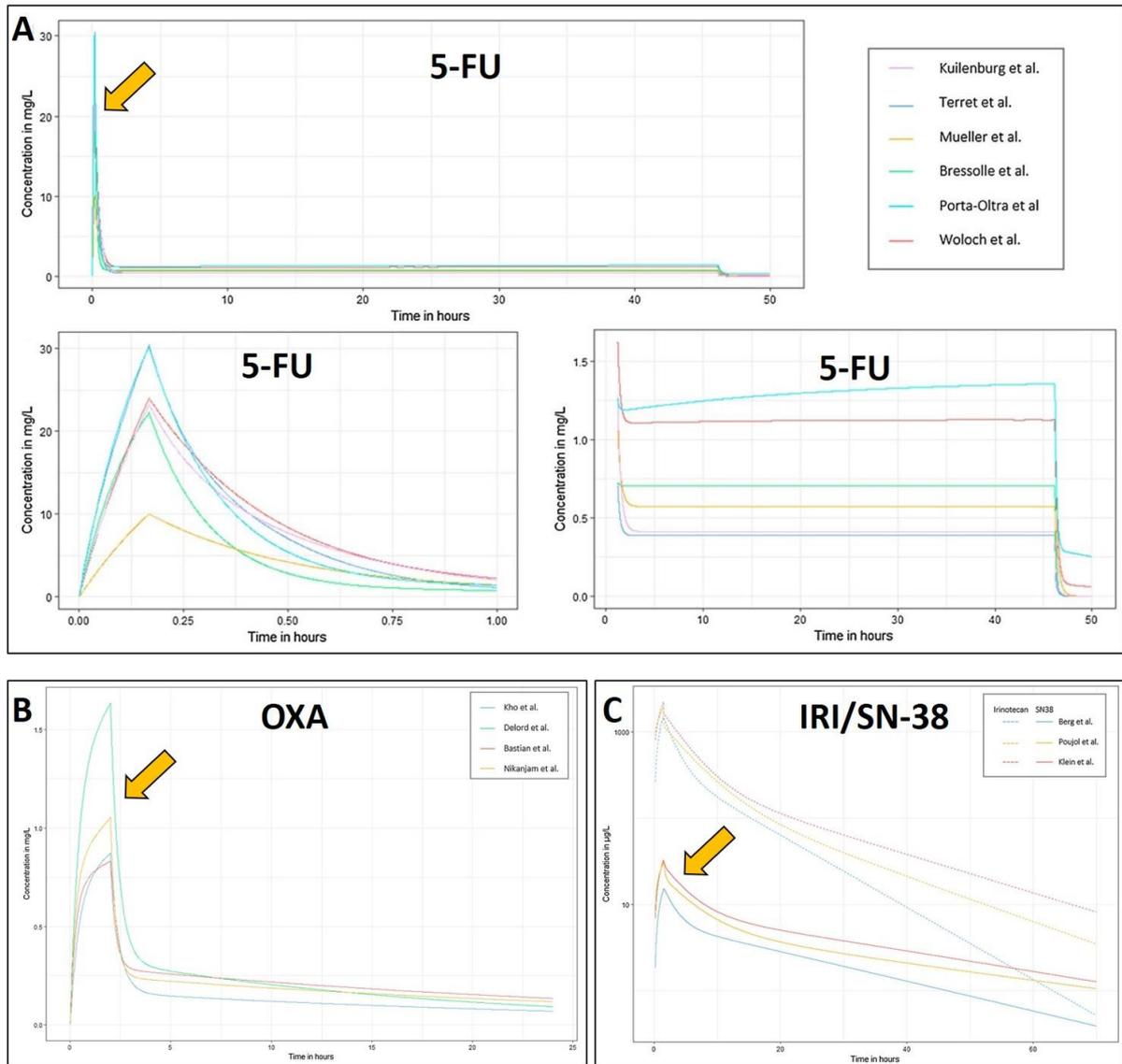


Figure 34. Courbes pharmacocinétiques du 5-FU (A), de l'oxaliplatine (B) et du SN-38 (C) adapté de Deyme *et al.* [241]. La flèche orange représente le pic de concentration.

Les essais réalisés avec cette modélisation de protocole FOLFIRINOX montrent un décalage d'IC<sub>50</sub> significatif entre la culture 2D classique, la culture 3D et la co-culture, à la fois en statique et en fluide. Un décalage avec des ordres de grandeurs identiques a pu être mis en évidence pour les traitements à base de gemcitabine, cisplatine et paclitaxel en système fluide (Tableau 8).

Tableau 8. Comparaison du décalage de l'IC<sub>50</sub> en fonction des modèles d'études du PDAC. CC : co-culture, S : statique, F : fluïdique.

	2D	3D S	3D F	CC 3D S	CC 3D F	Réf.
Gemcitabine	31 nM	85 nM (2,7x 2D)	277 nM (8,9x 2D)	-	-	[180]
Paclitaxel	0,2 nM	-	-	-	100 nM (500x 2D)	[184]
Cisplatine	3 nM	15 nM (5x 2D)	100 nM (33,3x 3D)	-	-	[178]
SN-38 dans notre modèle	66 nM	91,25 nM (1,4x 2D)	800 nM (12,1x 2D)	90 nM (1,36x 2D)	350 nM (5,3x 2D)	-

Cette observation démontre l'importance des modèles *in vitro* 3D microfluidique de tumeurs afin de permettre l'étude ou le développement de nouvelles thérapies pour le PDAC [178], [180], [184].

Cependant, la pertinence de l'IC<sub>50</sub> en co-culture est toutefois à considérer avec précaution car nous avons certes atteint une inhibition de 50% mais parmi les cellules mortes, avons-nous tué plus de PSC ?, plus sensibles à la chimiothérapie d'après notre modèle 2D, plus de cellules tumorales ? ou une répartition équitable ? Les protocoles actuels ne nous permettent pas de quantifier cette information. Toutefois, d'un point de vue visuel, il semblerait que la mortalité cellulaire soit plus importante pour les PSC.

Il peut y avoir plusieurs explications à la mortalité supérieure des PS-1 par rapport aux Capan-2. La première est la métabolisation et l'accession de la drogue à la cellule. Les Capan-2 sont des cellules épithéliales, ce qui se traduit phénotypiquement par un ensemble très compact de cellules (îlots en 2D et sphéroïdes en 3D). Or, ce phénotype est propice à entraver l'accessibilité des drogues, car l'épithélium formé agit comme une barrière et la drogue passe donc difficilement à travers pour toucher les cellules au cœur des îlots/sphères ; ce qui est finalement le rôle premier d'un épithélium : faire barrage aux agressions et protéger le milieu intérieur. La deuxième raison peut être la résistance intrinsèque des cellules. Dans ce cas, les Capan-2 mettraient naturellement en place davantage de mécanismes de chimiorésistance comme l'activation de pompes permettant de transporter les drogues en dehors des cellules.

Bien qu'observé dans plusieurs études, ce décalage d'IC<sub>50</sub> peut être remis en question sur deux points. Le premier concerne le PDMS et sa capacité à absorber les molécules, ce qui n'a malheureusement pas pu être quantifié. Le second point porte sur la distribution bi-compartmentale des chimiothérapies simulées par notre système. Les cellules reçoivent-elles exactement la concentration injectée ? Cet aspect est toutefois mis en évidence par notre expérience sur le transport de masse qui montre que nous obtenons bien une concentration identique dans la zone de convection du canal central et dans les canaux latéraux.

Parmi les trois drogues associées, celle ayant l'effet cytotoxique le plus important est l'irinotécan/SN-38. En comparant nos résultats avec une étude réalisée sur 34 lignées pancréatiques traitées avec 8 drogues différentes, dont l'irinotécan [246], la moyenne des IC<sub>50</sub> obtenues dans cette étude en culture 2D classique avec l'irinotécan est de 3 602 nM et la médiane de 1 924 nM. Les valeurs, allant de 144 nM à 10 000 nM, prouvent qu'il existe une grande variabilité en termes de réponse aux chimiothérapies au sein des tumeurs. Ceci montre le besoin d'apporter une thérapie personnalisée et la nécessité de développer des plateformes de criblage à haut débit. Si les valeurs de l'étude sont ramenées à une concentration de SN-38 métabolisé à 5%, nous obtenons une moyenne de 180 nM et une médiane de 96 nM ce qui est en accord avec nos résultats (Tableau 8).

L'effet cytotoxique de l'irinotécan/SN-38 est lié à l'inactivation de SMAD4<sup>11</sup> régulant ainsi la voie du TGF- $\beta$  [246]. Bien que l'inactivation ou la perte de SMAD4 se produise dans la majorité des tumeurs du pancréas, cibler SMAD4 comme traitement du PDAC peut aussi être un échec en raison de la présence de voies de signalisation du TGF- $\beta$  indépendantes de SMAD4 [247], [248]. En effet, il a été montré que dans des lignées cellulaires de PDAC déficientes en SMAD4, l'activation et la production du TGF- $\beta$  se faisait de manière autocrine [249], [250]. Dans notre cas, les Capan-2 présentent naturellement une expression de SMAD4 et donc une chimiorésistance intrinsèque accrue [215].

La production de TGF- $\beta$  par les cellules tumorales active les PSC qui, à leur tour, sécrètent divers facteurs dont les EGF, les FGF et le collagène I. Cette activation des PSC favorise la TEM [251]–[253] ainsi que la croissance tumorale, l'invasion et la

---

<sup>11</sup> SMAD4 est le coactivateur et le médiateur de la transduction requis pour la signalisation médiée par le TGF- $\beta$

résistance à la chimiothérapie [254]. Il a été démontré que l'expression de marqueurs liés à la TEM, tels que la vimentine et le TGF- $\beta$ , était plus élevée dans les sphéroïdes co-cultivés avec des PSC que dans les sphéroïdes mono-cultivés [179]. Un autre facteur jouant un rôle dans la TEM est la pression du liquide interstitiel (PLI), son effet sur les cellules tumorales module l'expression de la vimentine et de l'E-Cadhérine conduisant vers un phénotype mésenchymateux [255].

D'après les résultats obtenus, nous avons choisi d'explorer la TEM induite par les PSC et la chimiothérapie car nous n'observons aucune différence d'expression des marqueurs clés en présence du flux interstitiel. Des études ont montré que les PSC activées peuvent induire la TEM en diminuant le niveau d'E-Cadhérine et en augmentant le niveau de vimentine dans les cellules tumorales par la sécrétion abondante d'EGF, de TGF- $\beta$  et de FGF [256], [257]. Par ailleurs, il a été clairement démontré que le TGF- $\beta$  est un acteur majeur de la TEM [258]–[261]. Dans le contexte du PDAC, l'expression du TGF- $\beta$  pourrait favoriser le développement tumoral, notamment par l'activation des PSC et l'induction de la TEM des cellules cancéreuses favorisant la formation de métastases [262]–[264]. Nous validons ainsi les résultats obtenus. Cependant, il serait intéressant de valider ces résultats en étudiant l'expression des facteurs de transcription impliqués dans la TEM tels que ZEB-1 ou SNAIL [26]. Malheureusement, cette analyse doit être faite par RT-qPCR et/ou Western blot et nécessite la récupération des cellules dans le dispositif.

En plus de la TEM, il semblerait que les fibroblastes induisent un phénotype dédifférencié d'après la néo expression de la vimentine lors de la co-culture sans traitement. Cette dédifférenciation pourrait mener à un phénotype souche. Les cellules souches cancéreuses sont caractérisées par leur chimiorésistance et leur capacité à reformer une tumeur après un traitement. Plusieurs études vont dans ce sens et montrent que les PSC favorisent l'apparition du phénotype souche par la sécrétion de TGF- $\beta$  [82], [265]. Néanmoins, nous ne pouvons affirmer ce résultat car nous n'étudions que l'expression de la vimentine. Pour aller plus loin, il serait intéressant de démontrer la présence des transporteurs ABC, de CD133 ou C-MET qui sont des marqueurs caractéristiques des cellules souches cancéreuses [266], [267].

Nous remarquons donc l'importance du TGF- $\beta$  dans ces processus de chimiorésistance, ce qui confirme des précédents résultats du laboratoire [268]–[270]. Il serait intéressant d'étudier cette voie de signalisation et les mécanismes liés afin de

comprendre son effet global. Une thérapie permettant de bloquer les différentes voies de production du TGF- $\beta$  dans la tumeur serait intéressante.

L'observation de la TEM et de la promotion d'un phénotype de type souche sous traitement FOLFIRINOX des cellules du PDAC (PANC-1 et MiaPaCa-2) a aussi été faite au laboratoire par le groupe du Dr Vincent dans des cultures 2D et 3D classiques. Leur étude montre que ces mécanismes de chimiorésistance interviennent dans les jours suivant le traitement plutôt que pendant celui-ci. Nos résultats seraient donc une phase de mise en place de ces phénomènes. Afin de valider ces observations, il serait intéressant de prolonger le protocole sur un temps plus long.

La diminution de l'expression d' $\alpha$ -SMA réduit l'activité contractile des PSC et permet une baisse de la rigidité de la MEC [271]. La réduction de sécrétion de fibronectine permet de diminuer la fibrose et donc de réduire la rigidité de la MEC. Nous avons vu en introduction que plus la MEC est dense, plus elle agit comme une barrière face aux chimiothérapies. Nous montrons ici l'impact du FOLFIRINOX sur les PSC permettant de dédensifier la MEC et un transport plus efficace des molécules. D'autre part, notre modèle ne simule que la première cure, alors que le traitement est répété tous les 14 jours (Thésaurus National de Cancérologie Digestive - Chapitre 9 : Cancer du pancréas - 27/06/2018). Il pourrait alors, dans un premier temps, réduire la quantité de stroma puis cibler la tumeur par la suite. Cependant, les résultats obtenus au laboratoire par le Dr Vincent démontrent la possibilité d'une chimiorésistance acquise en post traitement et remettent donc en cause cette hypothèse. Nous avons aussi montré en introduction que le ciblage du stroma pouvait avoir un effet pro-tumorigène et induirait donc une augmentation de la chimiorésistance.

L'augmentation de volume des PS-1 est un signe de souffrance cellulaire qui a pu être observée sur des cellules tumorales ou des fibroblastes avec des traitements à base de cisplatine [245] ou de paclitaxel [244]. Cette observation pourrait être le signe de la sénescence des PS-1 caractérisée par un nombre de cellules réduit mais de plus gros volume [272], sénescence qui serait alors induite par le FOLFIRINOX. La sénescence a également été observée avec d'autres thérapies sur les fibroblastes [244] ou sur les cellules tumorales [273]. Il est décrit que la sénescence des cellules stellaires dans le foie se traduit par une augmentation de la taille des cellules ainsi qu'une réduction de la sécrétion de fibronectine, mais les PSC restent activées avec une expression de l' $\alpha$ -SMA et de la vimentine constante [274]. Ces résultats vont en partie dans le sens

de nos observations avec une nette réduction de la fibronectine et de l'activation des PSC. Néanmoins, nous observons une diminution des marqueurs d'activation. Cette différence serait due à notre méthode d'analyse normalisant l'expression des marqueurs sur l'expression du noyau, or le noyau est ici plus gros donc le rapport sera plus faible. Bien que la méthode d'analyse semble fiable, nous atteignons ici les limites de la microscopie à fluorescence en termes de méthode quantitative, d'où la nécessité de pouvoir récupérer les cellules dans le système. Enfin, la sénescence a un effet pro-tumorigène et participe à la chimiorésistance [244], [275]. Ceci expliquerait pourquoi nous avons un décalage d' $IC_{50}$  entre la co-culture et la monoculture. Les facteurs inflammatoires sécrétés par les cellules sénescents favorisent divers aspects de la tumorigénèse, y compris la prolifération des cellules cancéreuses, de la migration, du pouvoir invasif et de la TEM [244]. Une étude de co-culture *in vitro* de lignées cellulaires épithéliales prénéoplasiques avec des fibroblastes pulmonaires sénescents a démontré que le taux de prolifération des cellules épithéliales prénéoplasiques était plus rapide que celui des co-cultures avec des fibroblastes non sénescents [276].

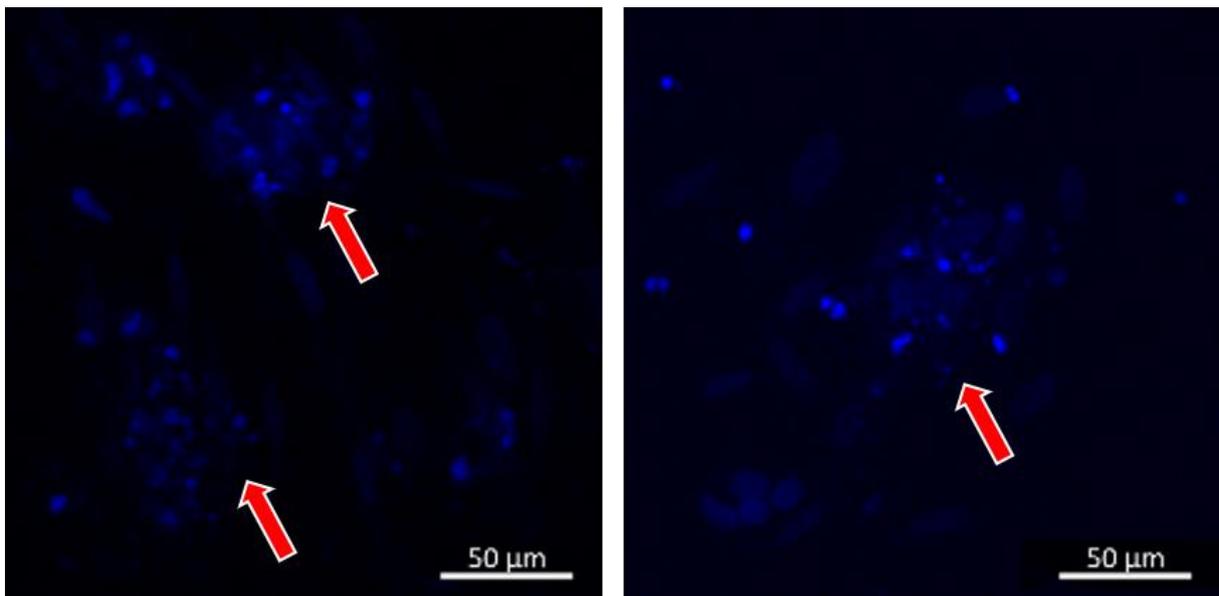


Figure 35. Visualisation des petits noyaux hyperchromatiques des PSC sous traitement (flèche rouge)

Le gonflement des cellules observé pourrait aussi être dû à de l'apoptose [245]. Après traitement, des observations rapportent un changement dystrophique prononcé, avec un cytoplasme volumineux, des noyaux élargis et gonflés ou de petits noyaux hyperchromatiques de forme irrégulière ce que nous observons également (Figure 35). La différence entre les deux états est que l'apoptose est un mécanisme de mort cellulaire, tandis que la sénescence entraîne l'arrêt du cycle cellulaire.

Afin de vérifier lequel de ces processus est en action, il faudrait alors prolonger le protocole de modélisation après traitement puis évaluer la prolifération des PSC par marquage du Ki67 ou l'incorporation de 5-Ethynyl-2'-désoxyuridine (Edu), et leur viabilité par un test Live/Dead.

Finalement, ces résultats, bien que préliminaires, montrent l'intérêt de notre modèle de co-culture *in vitro* 3D microfluidique pour l'étude et la compréhension des mécanismes de chimiorésistance du PDAC vis-à-vis des chimiothérapies incluant le protocole FOLFIRINOX. Ce système a aussi permis de modéliser la dynamique d'un protocole complexe et de visualiser des processus de TEM et/ou de promotion de dédifférenciation.



## Chapitre 4 : Conclusions et Perspectives

### I. Conclusions

Ces travaux de thèse ont permis de développer un système complexe de co-culture *in vitro* 3D et microfluidique dans le but de répondre à un besoin identifié des chercheurs, faire évoluer les modèles d'études actuels pouvant démontrer certaines limites notamment en termes de pertinence physiologique. En réponse à cette demande, notre modèle a été conçu afin de représenter de manière pertinente le microenvironnement physiologique du PDAC et de combiner dans un même système, une matrice permettant de reproduire l'environnement 3D, une co-culture de PSC avec des cellules tumorales recréant l'hétérogénéité cellulaire au sein d'une tumeur pancréatique et une perfusion mimant la vascularisation.

La faisabilité de ce modèle a été montrée après une étude numérique dans un premier temps, nous permettant de modéliser le remplissage puis de calculer les paramètres pertinents comme la vitesse d'écoulement ou le transport de masse. Nous avons ensuite validé cette approche expérimentalement, les points critiques étant le remplissage du système, le maintien de la culture, l'activation des PSC (paramètre important pour l'étude des interactions tumeur-stroma) et la génération d'un flux interstitiel. La matrice extracellulaire ayant répondu à nos critères est une association de collagène I et de HA créant une structure rigide proche des conditions *in vivo*. Elle permet le maintien de la culture à long terme en ne se dégradant pas ou peu sous l'effet de la perfusion ainsi qu'une activation des PSC. La vitesse de perfusion choisie permet quant à elle d'appliquer un flux interstitiel équivalent à celui observé dans le microenvironnement *in vivo*, induisant une pression hydrostatique et une contrainte de cisaillement sur les cellules.

La perfusion est aussi utilisée pour modéliser la cinétique d'un protocole multidrogues complexe, le FOLFIRINOX, jusque-là non référencé. Cette approche est rendue possible grâce aux dosages en temps réel des drogues *via* les canaux microfluidiques simulant ainsi le phénomène de bi-compartmentalité observée *in vivo*. Ceci constitue un réel avantage pour étudier la chimiorésistance. Les résultats obtenus montrent une chimiorésistance accrue des cellules tumorales dans notre modèle. En effet, le microenvironnement et la co-culture des cellules tumorales avec des PSC influent directement sur l'IC<sub>50</sub>. Nous avons aussi montré la mise en place d'un processus ayant des caractéristiques de la TEM à la fois en mono et en co-culture et d'une possible

promotion d'un phénotype dédifférencié (de type souche ?) des cellules tumorales par les PSC activées.

Finalement, nous présentons dans cette thèse un modèle innovant pour étudier la chimiorésistance et les interactions tumeur-stroma dans le PDAC. Avec l'apport d'améliorations technologiques et techniques supplémentaires, ce modèle pourrait devenir un réel outil d'analyse et de criblage à haut débit pour l'étude de nouvelles thérapies ou l'application de protocoles personnalisés.

## **II. Perspectives**

Suite à ces travaux, de nombreuses perspectives d'aspects technologiques et biologiques sont envisageables.

Nous avons pu montrer dans un premier temps, les limitations technologiques de notre modèle qui nécessitent des améliorations dans le dispositif. Tout d'abord, fournir un système ou une méthode permettant la récupération des cellules semble être une priorité afin de pouvoir mettre en œuvre d'autres techniques d'analyses biologiques et/ou biochimiques.

Deuxièmement, améliorer la méthode de remplissage et l'interface MEC/fluide, ce qui permettra une utilisation simplifiée du système et l'accès à l'ensemble des solutions existantes pour modéliser la MEC du PDAC. Cette modification facilitera la suivante qui est la parallélisation et la mise en place de systèmes à haut débit. En effet, cette limitation actuelle rend l'étude longue et fastidieuse, 3 analyses par semaine dans notre cas, alors qu'une simple plaque, certes moins pertinente physiologiquement, permet d'analyser un très grand nombre de conditions en parallèle. Une réflexion sur une géométrie prenant en compte ce point est nécessaire si nous souhaitons démocratiser notre modèle. Ce point semblant futile est un réel frein à l'utilisation de notre système par les biologistes.

Enfin, l'ajout de capteurs permettant de mesurer la pression *in situ* ou les concentrations en temps réel en glucose, oxygène ou chimiothérapie semble envisageable et permettrait d'affirmer clairement que nous contrôlons précisément le microenvironnement du système.

Du point de vue biologique, il serait intéressant d'approfondir nos résultats qui ne sont pour le moment que préliminaires. L'étude de la voie du TGF- $\beta$  semble indispensable pour comprendre les mécanismes de chimiorésistance, tel que la TEM, ainsi que les

interactions tumeur-stroma. Tout comme l'étude des protéines de résistance aux drogues de la famille des MRP, très actives dans les cellules chimiorésistantes à la gemcitabine, qui ne sont pas mises en évidence dans notre modèle avec le FOLFIRINOX. Ou encore l'étude de l'expression des facteurs de transcription impliqués dans la TEM tels que ZEB-1 ou SNAIL [26].

Pour aller plus loin sur la promotion d'un phénotype dédifférencié de type souche lors de la co-culture entre les PSC et les cellules tumorales, il serait intéressant de montrer ou non la présence des transporteurs ABC, de CD133 ou C-MET qui sont des marqueurs caractéristiques des cellules souches cancéreuses [266]. Puis, afin de prolonger nos observations sur la sénescence ou l'apoptose des PSC, une étude du facteur de transcription p53 ou la  $\beta$ -galactosidase, ayant un rôle clé dans la sénescence, semble nécessaire afin de déterminer si ce processus est en place dans les PS-1 [277], [278]. Pour l'apoptose, il serait intéressant d'étudier les marqueurs de la famille des facteurs de nécrose tumorale (TNF) [279]. Ces expériences nécessitent un rallongement du protocole d'analyse au-delà du simple traitement. D'autres analyses complémentaires peuvent être effectuées, notamment une étude sur la prolifération cellulaire des PSC ainsi que des cellules tumorales avec le marqueur Ki67 afin d'évaluer l'effet de la chimiothérapie sur ce paramètre.

Le modèle actuel ne se basant que sur une lignée de PSC et une lignée tumorale, il serait intéressant de généraliser nos résultats avec d'autres lignées. En effet, nous avons pu voir qu'il existait une grande variabilité en termes de réponses aux chimiothérapies au sein des tumeurs et qu'un seul modèle ne peut conclure sur l'ensemble des mécanismes.

La société HCS Pharma proposant une personnalisation des propriétés de Biomimesys® *Oncology*, il serait intéressant de faire varier la rigidité de la matrice dans notre modèle et d'étudier l'influence de ce changement sur les cellules tumorales et stellaires ainsi que sur leur réponse aux chimiothérapies.

Enfin, notre modélisation est centrée sur une chimiorésistance intrinsèque des cellules, l'étude de l'acquisition de la résistance après traitement, qui intéresse aussi notre laboratoire ainsi que la communauté scientifique, semble intéressante et complémentaire. Pour cela, une méthode simple d'allongement du protocole peut être mise en place avec une étude après plusieurs cures. Cet allongement peut aussi être fait en parallèle de l'étude sur la sénescence et l'apoptose.



## Références bibliographiques

- [1] N. Bardeesy et R. A. DePinho, « Pancreatic cancer biology and genetics », *Nat Rev Cancer*, vol. 2, n° 12, p. 897-909, déc. 2002, doi: 10.1038/nrc949.
- [2] H. Han et D. D. Von Hoff, « SnapShot: Pancreatic Cancer », *Cancer Cell*, vol. 23, n° 3, p. 424-424.e1, mars 2013, doi: 10.1016/j.ccr.2013.03.008.
- [3] V. L. Gordon-Dseagu, S. S. Devesa, M. Goggins, et R. Stolzenberg-Solomon, « Pancreatic cancer incidence trends: evidence from the Surveillance, Epidemiology and End Results (SEER) population-based data », *International Journal of Epidemiology*, vol. 47, n° 2, p. 427-439, avr. 2018, doi: 10.1093/ije/dyx232.
- [4] A. Jemal, R. Siegel, J. Xu, et E. Ward, « Cancer Statistics, 2010 », *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, vol. 60, n° 5, p. 277-300, sept. 2010, doi: 10.3322/caac.20073.
- [5] P. Rawla, T. Sunkara, et V. Gaduputi, « Epidemiology of Pancreatic Cancer: Global Trends, Etiology and Risk Factors », *World J Oncol*, vol. 10, n° 1, p. 10-27, 2019, doi: 10.14740/wjon1166.
- [6] L. Rahib, B. D. Smith, R. Aizenberg, A. B. Rosenzweig, J. M. Fleshman, et L. M. Matrisian, « Projecting Cancer Incidence and Deaths to 2030: The Unexpected Burden of Thyroid, Liver, and Pancreas Cancers in the United States », *Cancer Research*, vol. 74, n° 11, p. 2913-2921, juin 2014, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-0155.
- [7] J. Kleeff *et al.*, « Pancreatic cancer », *Nat Rev Dis Primers*, vol. 2, n° 1, p. 16022, déc. 2016, doi: 10.1038/nrdp.2016.22.
- [8] M. Distler, D. Aust, J. Weitz, C. Pilarsky, et R. Grützmann, « Precursor Lesions for Sporadic Pancreatic Cancer: PanIN, IPMN, and MCN », *BioMed Research International*, vol. 2014, p. 1-11, 2014, doi: 10.1155/2014/474905.
- [9] R. H. Hruban, M. Goggins, J. Parsons, et S. E. Kern, « Progression Model for Pancreatic Cancer », *Clinical Cancer Research*, vol. 6, p. 2969-2972, août 2000.
- [10] A. Maitra et R. H. Hruban, « Pancreatic Cancer », *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.*, vol. 3, n° 1, p. 157-188, févr. 2008, doi: 10.1146/annurev.pathmechdis.3.121806.154305.
- [11] J. P. Neoptolemos, J. Kleeff, P. Michl, E. Costello, W. Greenhalf, et D. H. Palmer, « Therapeutic developments in pancreatic cancer: current and future perspectives », *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, vol. 15, n° 6, p. 333-348, juin 2018, doi: 10.1038/s41575-018-0005-x.
- [12] C. L. Wolfgang *et al.*, « Recent progress in pancreatic cancer: Pancreatic Cancer », *CA A Cancer Journal for Clinicians*, vol. 63, n° 5, p. 318-348, sept. 2013, doi: 10.3322/caac.21190.
- [13] J. He *et al.*, « 2564 resected periampullary adenocarcinomas at a single institution: trends over three decades », *HPB*, vol. 16, n° 1, p. 83-90, janv. 2014, doi: 10.1111/hpb.12078.

- [14] A. Vincent, J. Herman, R. Schulick, R. H. Hruban, et M. Goggins, « Pancreatic cancer », *The Lancet*, vol. 378, n° 9791, p. 607-620, août 2011, doi: 10.1016/S0140-6736(10)62307-0.
- [15] J. Hu *et al.*, « A meta-analysis of gemcitabine containing chemotherapy for locally advanced and metastatic pancreatic adenocarcinoma », *J Hematol Oncol*, vol. 4, n° 1, p. 11, 2011, doi: 10.1186/1756-8722-4-11.
- [16] H. Burris et A. M. Storniolo, « Assessing clinical benefit in the treatment of pancreas cancer: Gemcitabine compared to 5-fluorouracil », *European Journal of Cancer*, vol. 33, p. S18-S22, janv. 1997, doi: 10.1016/S0959-8049(96)00324-3.
- [17] T. Conroy *et al.*, « FOLFIRINOX versus Gemcitabine for Metastatic Pancreatic Cancer », *The New England Journal of Medicine*, p. 9, 2011.
- [18] D. Goldstein *et al.*, « nab-Paclitaxel Plus Gemcitabine for Metastatic Pancreatic Cancer: Long-Term Survival From a Phase III Trial », *JNCI Journal of the National Cancer Institute*, vol. 107, n° 2, p. dju413-dju413, janv. 2015, doi: 10.1093/jnci/dju413.
- [19] R. Vasseur, « Etude de la régulation de la mucine MUC4 par l'oncogene K-ras dans le cancer du pancréas », These de doctorat, Lille 2, 2015.
- [20] S. Kelderman, T. N. M. Schumacher, et J. B. A. G. Haanen, « Acquired and intrinsic resistance in cancer immunotherapy », *Molecular Oncology*, vol. 8, n° 6, p. 1132-1139, sept. 2014, doi: 10.1016/j.molonc.2014.07.011.
- [21] A. M. Bergman, H. M. Pinedo, et G. J. Peters, « Determinants of resistance to 2',2'-difluorodeoxycytidine (gemcitabine) », *Drug Resistance Updates*, vol. 5, n° 1, p. 19-33, févr. 2002, doi: 10.1016/S1368-7646(02)00002-X.
- [22] X. Zheng *et al.*, « Epithelial-to-mesenchymal transition is dispensable for metastasis but induces chemoresistance in pancreatic cancer », *Nature*, vol. 527, n° 7579, p. 525-530, nov. 2015, doi: 10.1038/nature16064.
- [23] T. Arumugam *et al.*, « Epithelial to Mesenchymal Transition Contributes to Drug Resistance in Pancreatic Cancer », *Cancer Research*, vol. 69, n° 14, p. 5820-5828, juill. 2009, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-2819.
- [24] M. El Amrani *et al.*, « Gemcitabine-induced epithelial-mesenchymal transition-like changes sustain chemoresistance of pancreatic cancer cells of mesenchymal-like phenotype », *Mol Carcinog*, vol. 58, n° 11, p. 1985-1997, 2019, doi: 10.1002/mc.23090.
- [25] K. Takahashi *et al.*, « Neoplastic spindle cells are an independent prognostic factor in pancreatic cancer », *Pancreas*, vol. 44, n° 5, p. 742-749, juill. 2015, doi: 10.1097/MPA.0000000000000337.
- [26] J. A. Galván *et al.*, « Expression of E-cadherin repressors SNAIL, ZEB1 and ZEB2 by tumour and stromal cells influences tumour-budding phenotype and suggests heterogeneity of stromal cells in pancreatic cancer », *British Journal of Cancer*, vol. 112, n° 12, Art. n° 12, juin 2015, doi: 10.1038/bjc.2015.177.
- [27] E. Chouat *et al.*, « Tumor budding is a prognostic factor linked to epithelial mesenchymal transition in pancreatic ductal adenocarcinoma. Study report and literature review », *Pancreatology*, vol. 18, n° 1, p. 79-84, janv. 2018, doi: 10.1016/j.pan.2017.11.010.

- [28] R. T. Lawlor *et al.*, « Prognostic Role of High-Grade Tumor Budding in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: A Systematic Review and Meta-Analysis with a Focus on Epithelial to Mesenchymal Transition », *Cancers (Basel)*, vol. 11, n° 1, janv. 2019, doi: 10.3390/cancers11010113.
- [29] M. Madurantakam Royam *et al.*, « miRNA Predictors of Pancreatic Cancer Chemotherapeutic Response: A Systematic Review and Meta-Analysis », *Cancers (Basel)*, vol. 11, n° 7, juin 2019, doi: 10.3390/cancers11070900.
- [30] F. Shao, M. Huang, F. Meng, et Q. Huang, « Circular RNA Signature Predicts Gemcitabine Resistance of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma », *Front Pharmacol*, vol. 9, juin 2018, doi: 10.3389/fphar.2018.00584.
- [31] W. Luo *et al.*, « Novel discoveries targeting gemcitabine-based chemoresistance and new therapies in pancreatic cancer: How far are we from the destination? », *Cancer Med*, vol. 8, n° 14, p. 6403-6413, sept. 2019, doi: 10.1002/cam4.2384.
- [32] F. Lahdaoui *et al.*, « miR-219-1-3p is a negative regulator of the mucin MUC4 expression and is a tumor suppressor in pancreatic cancer », *Oncogene*, vol. 34, n° 6, p. 780-788, févr. 2015, doi: 10.1038/onc.2014.11.
- [33] S. Tréhoux *et al.*, « Micro-RNAs miR-29a and miR-330-5p function as tumor suppressors by targeting the MUC1 mucin in pancreatic cancer cells », *Biochim Biophys Acta*, vol. 1853, n° 10 Pt A, p. 2392-2403, oct. 2015, doi: 10.1016/j.bbamcr.2015.05.033.
- [34] N. Jonckheere, F. Lahdaoui, et I. Van Seuningen, « Targeting MUC4 in pancreatic cancer: miRNAs », *Oncoscience*, vol. 2, n° 10, p. 799-800, sept. 2015, doi: 10.18632/oncoscience.249.
- [35] D. Delitto *et al.*, « The inflammatory milieu within the pancreatic cancer microenvironment correlates with clinicopathologic parameters, chemoresistance and survival », *BMC Cancer*, vol. 15, oct. 2015, doi: 10.1186/s12885-015-1820-x.
- [36] F. Cao, J. Li, H. Sun, S. Liu, Y. Cui, et F. Li, « HES 1 is essential for chemoresistance induced by stellate cells and is associated with poor prognosis in pancreatic cancer », *Oncol Rep*, vol. 33, n° 4, p. 1883-1889, avr. 2015, doi: 10.3892/or.2015.3789.
- [37] H. Zhang *et al.*, « Paracrine SDF-1 $\alpha$  signaling mediates the effects of PSCs on GEM chemoresistance through an IL-6 autocrine loop in pancreatic cancer cells », *Oncotarget*, vol. 6, n° 5, p. 3085-3097, déc. 2014.
- [38] Y. Liu *et al.*, « Periostin promotes the chemotherapy resistance to gemcitabine in pancreatic cancer », *Tumour Biol*, vol. 37, n° 11, p. 15283-15291, nov. 2016, doi: 10.1007/s13277-016-5321-6.
- [39] A. B. Seymour *et al.*, « Allelotype of pancreatic adenocarcinoma », *Cancer Res*, vol. 54, n° 10, p. 2761-2764, mai 1994.
- [40] H. Meng et A. E. Nel, « Use of Nano Engineered Approaches to Overcome the Stromal Barrier in Pancreatic Cancer », *Adv Drug Deliv Rev*, vol. 130, p. 50-57, mai 2018, doi: 10.1016/j.addr.2018.06.014.

- [41] M. V. Apte, Z. Xu, S. Pothula, D. Goldstein, R. C. Pirola, et J. S. Wilson, « Pancreatic cancer: The microenvironment needs attention too! », *Pancreatology*, vol. 15, n° 4 Suppl, p. S32-38, juill. 2015, doi: 10.1016/j.pan.2015.02.013.
- [42] S. P. Pothula, Z. Xu, D. Goldstein, R. C. Pirola, J. S. Wilson, et M. V. Apte, « Key role of pancreatic stellate cells in pancreatic cancer », *Cancer Lett*, vol. 381, n° 1, p. 194-200, 10 2016, doi: 10.1016/j.canlet.2015.10.035.
- [43] C. E. Clark, S. R. Hingorani, R. Mick, C. Combs, D. A. Tuveson, et R. H. Vonderheide, « Dynamics of the immune reaction to pancreatic cancer from inception to invasion », *Cancer Res*, vol. 67, n° 19, p. 9518-9527, oct. 2007, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-0175.
- [44] M. Samandari, M. G. Julia, A. Rice, A. Chronopoulos, et A. E. del Rio Hernandez, « Liquid biopsies for management of pancreatic cancer », *Translational Research*, vol. 201, p. 98-127, nov. 2018, doi: 10.1016/j.trsl.2018.07.008.
- [45] A. Y. Wehr, E. E. Furth, V. Sangar, I. A. Blair, et K. H. Yu, « Analysis of the human pancreatic stellate cell secreted proteome », *Pancreas*, vol. 40, n° 4, p. 557-566, mai 2011, doi: 10.1097/MPA.0b013e318214efaf.
- [46] D. Mahadevan et D. D. Von Hoff, « Tumor-stroma interactions in pancreatic ductal adenocarcinoma », *Molecular Cancer Therapeutics*, vol. 6, n° 4, p. 1186-1197, avr. 2007, doi: 10.1158/1535-7163.MCT-06-0686.
- [47] A. Neesse *et al.*, « Stromal biology and therapy in pancreatic cancer », *Gut*, vol. 60, n° 6, p. 861-868, juin 2011, doi: 10.1136/gut.2010.226092.
- [48] R. Grantab, S. Sivanathan, et I. F. Tannock, « The Penetration of Anticancer Drugs through Tumor Tissue as a Function of Cellular Adhesion and Packing Density of Tumor Cells », *Cancer Res*, vol. 66, n° 2, p. 1033-1039, janv. 2006, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-3077.
- [49] T. Wu et Y. Dai, « Tumor microenvironment and therapeutic response », *Cancer Letters*, vol. 387, p. 61-68, févr. 2017, doi: 10.1016/j.canlet.2016.01.043.
- [50] O. Trédan, C. M. Galmarini, K. Patel, et I. F. Tannock, « Drug resistance and the solid tumor microenvironment », *J Natl Cancer Inst*, vol. 99, n° 19, p. 1441-1454, oct. 2007, doi: 10.1093/jnci/djm135.
- [51] D. Hanahan et R. A. Weinberg, « Hallmarks of Cancer: The Next Generation », *Cell*, vol. 144, n° 5, p. 646-674, mars 2011, doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
- [52] T. Akino *et al.*, « Cytogenetic Abnormalities of Tumor-Associated Endothelial Cells in Human Malignant Tumors », *Am J Pathol*, vol. 175, n° 6, p. 2657-2667, déc. 2009, doi: 10.2353/ajpath.2009.090202.
- [53] D. N. Amin, K. Hida, D. R. Bielenberg, et M. Klagsbrun, « Tumor endothelial cells express epidermal growth factor receptor (EGFR) but not ErbB3 and are responsive to EGF and to EGFR kinase inhibitors », *Cancer Res*, vol. 66, n° 4, p. 2173-2180, févr. 2006, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-3387.
- [54] S. J. Turley, V. Cremasco, et J. L. Astarita, « Immunological hallmarks of stromal cells in the tumour microenvironment », *Nat Rev Immunol*, vol. 15, n° 11, p. 669-682, nov. 2015, doi: 10.1038/nri3902.

- [55] J. E. Talmadge et D. I. Gabrilovich, « History of myeloid-derived suppressor cells », *Nat Rev Cancer*, vol. 13, n° 10, p. 739-752, 2013, doi: 10.1038/nrc3581.
- [56] J. K. Mulligan, S. A. Rosenzweig, et M. R. I. Young, « Tumor Secretion of VEGF Induces Endothelial Cells to Suppress T cell Functions Through the Production of PGE2 », *J Immunother*, vol. 33, n° 2, p. 126-135, 2010, doi: 10.1097/CJI.0b013e3181b91c9c.
- [57] N. Rodig *et al.*, « Endothelial expression of PD-L1 and PD-L2 down-regulates CD8+ T cell activation and cytotoxicity », *Eur J Immunol*, vol. 33, n° 11, p. 3117-3126, nov. 2003, doi: 10.1002/eji.200324270.
- [58] B. Qian et J. W. Pollard, « Macrophage Diversity Enhances Tumor Progression and Metastasis », *Cell*, vol. 141, n° 1, p. 39-51, avr. 2010, doi: 10.1016/j.cell.2010.03.014.
- [59] R. Ostuni, F. Kratochvill, P. J. Murray, et G. Natoli, « Macrophages and cancer: from mechanisms to therapeutic implications », *Trends Immunol*, vol. 36, n° 4, p. 229-239, avr. 2015, doi: 10.1016/j.it.2015.02.004.
- [60] A. Mantovani et P. Allavena, « The interaction of anticancer therapies with tumor-associated macrophages », *J Exp Med*, vol. 212, n° 4, p. 435-445, avr. 2015, doi: 10.1084/jem.20150295.
- [61] D. G. DeNardo *et al.*, « Leukocyte Complexity Predicts Breast Cancer Survival and Functionally Regulates Response to Chemotherapy », *Cancer Discov*, vol. 1, p. 54-67, juin 2011, doi: 10.1158/2159-8274.CD-10-0028.
- [62] E. M. Dijkgraaf *et al.*, « Chemotherapy alters monocyte differentiation to favor generation of cancer-supporting M2 macrophages in the tumor microenvironment », *Cancer Res*, vol. 73, n° 8, p. 2480-2492, avr. 2013, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-3542.
- [63] T. Shree *et al.*, « Macrophages and cathepsin proteases blunt chemotherapeutic response in breast cancer », *Genes Dev*, vol. 25, n° 23, p. 2465-2479, déc. 2011, doi: 10.1101/gad.180331.111.
- [64] D. I. Gabrilovich, S. Ostrand-Rosenberg, et V. Bronte, « Coordinated regulation of myeloid cells by tumours », *Nat Rev Immunol*, vol. 12, n° 4, p. 253-268, mars 2012, doi: 10.1038/nri3175.
- [65] S. Acharyya *et al.*, « A CXCL1 paracrine network links cancer chemoresistance and metastasis », *Cell*, vol. 150, n° 1, p. 165-178, juill. 2012, doi: 10.1016/j.cell.2012.04.042.
- [66] B. Raychaudhuri *et al.*, « Myeloid-derived suppressor cell accumulation and function in patients with newly diagnosed glioblastoma », *Neuro Oncol*, vol. 13, n° 6, p. 591-599, juin 2011, doi: 10.1093/neuonc/nor042.
- [67] R. Kalluri, « The biology and function of fibroblasts in cancer », *Nat Rev Cancer*, vol. 16, n° 9, p. 582-598, 23 2016, doi: 10.1038/nrc.2016.73.
- [68] M. Erkan *et al.*, « The activated stroma index is a novel and independent prognostic marker in pancreatic ductal adenocarcinoma », *Clin Gastroenterol Hepatol*, vol. 6, n° 10, p. 1155-1161, oct. 2008, doi: 10.1016/j.cgh.2008.05.006.

- [69] S. R. Nielsen *et al.*, « Macrophage-secreted granulin supports pancreatic cancer metastasis by inducing liver fibrosis », *Nat Cell Biol*, vol. 18, n° 5, p. 549-560, mai 2016, doi: 10.1038/ncb3340.
- [70] H. Laklai *et al.*, « Genotype tunes pancreatic ductal adenocarcinoma tissue tension to induce matricellular-fibrosis and tumor progression », *Nat Med*, vol. 22, n° 5, p. 497-505, mai 2016, doi: 10.1038/nm.4082.
- [71] C. Duluc *et al.*, « Pharmacological targeting of the protein synthesis mTOR/4E-BP1 pathway in cancer-associated fibroblasts abrogates pancreatic tumour chemoresistance », *EMBO Mol Med*, vol. 7, n° 6, p. 735-753, juin 2015, doi: 10.15252/emmm.201404346.
- [72] K. P. Olive *et al.*, « Inhibition of Hedgehog signaling enhances delivery of chemotherapy in a mouse model of pancreatic cancer », *Science*, vol. 324, n° 5933, p. 1457-1461, juin 2009, doi: 10.1126/science.1171362.
- [73] J. M. Bailey *et al.*, « Sonic hedgehog promotes desmoplasia in pancreatic cancer », *Clin Cancer Res*, vol. 14, n° 19, p. 5995-6004, oct. 2008, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-08-0291.
- [74] S. J. Scales et F. J. de Sauvage, « Mechanisms of Hedgehog pathway activation in cancer and implications for therapy », *Trends Pharmacol Sci*, vol. 30, n° 6, p. 303-312, juin 2009, doi: 10.1016/j.tips.2009.03.007.
- [75] U. Tostar, R. Toftgård, P. G. Zaphiropoulos, et T. Shimokawa, « Reduction of human embryonal rhabdomyosarcoma tumor growth by inhibition of the hedgehog signaling pathway », *Genes Cancer*, vol. 1, n° 9, p. 941-951, sept. 2010, doi: 10.1177/1947601910385449.
- [76] M. Hui, A. Cazet, R. Nair, D. N. Watkins, S. A. O'Toole, et A. Swarbrick, « The Hedgehog signalling pathway in breast development, carcinogenesis and cancer therapy », *Breast Cancer Res*, vol. 15, n° 2, p. 203, avr. 2013, doi: 10.1186/bcr3401.
- [77] D. N. Watkins, D. M. Berman, S. G. Burkholder, B. Wang, P. A. Beachy, et S. B. Baylin, « Hedgehog signalling within airway epithelial progenitors and in small-cell lung cancer », *Nature*, vol. 422, n° 6929, Art. n° 6929, mars 2003, doi: 10.1038/nature01493.
- [78] S. S. Karhadkar *et al.*, « Hedgehog signalling in prostate regeneration, neoplasia and metastasis », *Nature*, vol. 431, n° 7009, p. 707-712, oct. 2004, doi: 10.1038/nature02962.
- [79] I. N. Sari, L. T. H. Phi, N. Jun, Y. T. Wijaya, S. Lee, et H. Y. Kwon, « Hedgehog Signaling in Cancer: A Prospective Therapeutic Target for Eradicating Cancer Stem Cells », *Cells*, vol. 7, n° 11, nov. 2018, doi: 10.3390/cells7110208.
- [80] E. Giroux Leprieur, D. M. Jablons, et B. He, « Old Sonic Hedgehog, new tricks: a new paradigm in thoracic malignancies », *Oncotarget*, vol. 9, n° 18, p. 14680-14691, févr. 2018, doi: 10.18632/oncotarget.24411.
- [81] P. Huang, F. Xiong, S. G. Megason, et A. F. Schier, « Attenuation of Notch and Hedgehog Signaling Is Required for Fate Specification in the Spinal Cord », *PLOS Genetics*, vol. 8, n° 6, p. e1002762, juin 2012, doi: 10.1371/journal.pgen.1002762.

- [82] S. Hamada *et al.*, « Pancreatic stellate cells enhance stem cell-like phenotypes in pancreatic cancer cells », *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 421, n° 2, p. 349-354, 2012, doi: 10.1016/j.bbrc.2012.04.014.
- [83] Z. Xu *et al.*, « Role of pancreatic stellate cells in pancreatic cancer metastasis », *Am J Pathol*, vol. 177, n° 5, p. 2585-2596, nov. 2010, doi: 10.2353/ajpath.2010.090899.
- [84] F. Di Maggio *et al.*, « Pancreatic stellate cells regulate blood vessel density in the stroma of pancreatic ductal adenocarcinoma », *Pancreatology*, vol. 16, n° 6, p. 995-1004, 2016, doi: 10.1016/j.pan.2016.05.393.
- [85] A. Ene-Obong *et al.*, « Activated pancreatic stellate cells sequester CD8+ T cells to reduce their infiltration of the juxtatumoral compartment of pancreatic ductal adenocarcinoma », *Gastroenterology*, vol. 145, n° 5, p. 1121-1132, nov. 2013, doi: 10.1053/j.gastro.2013.07.025.
- [86] T. A. Mace, M. Bloomston, et G. B. Lesinski, « Pancreatic cancer-associated stellate cells: A viable target for reducing immunosuppression in the tumor microenvironment », *Oncoimmunology*, vol. 2, n° 7, p. e24891, juill. 2013, doi: 10.4161/onci.24891.
- [87] Y. Ma, R. F. Hwang, C. D. Logsdon, et S. E. Ullrich, « Dynamic mast cell-stromal cell interactions promote growth of pancreatic cancer », *Cancer Res*, vol. 73, n° 13, p. 3927-3937, juill. 2013, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-4479.
- [88] C. Shi *et al.*, « Fibrogenesis in pancreatic cancer is a dynamic process regulated by macrophage-stellate cell interaction », *Lab Invest*, vol. 94, n° 4, p. 409-421, avr. 2014, doi: 10.1038/labinvest.2014.10.
- [89] N. Ikenaga *et al.*, « CD10+ Pancreatic Stellate Cells Enhance the Progression of Pancreatic Cancer », *Gastroenterology*, vol. 139, n° 3, p. 1041-1051.e8, sept. 2010, doi: 10.1053/j.gastro.2010.05.084.
- [90] S. Endo *et al.*, « Autophagy Is Required for Activation of Pancreatic Stellate Cells, Associated With Pancreatic Cancer Progression and Promotes Growth of Pancreatic Tumors in Mice », *Gastroenterology*, vol. 152, n° 6, p. 1492-1506.e24, mai 2017, doi: 10.1053/j.gastro.2017.01.010.
- [91] J. J. Lee *et al.*, « Stromal response to Hedgehog signaling restrains pancreatic cancer progression », *PNAS*, vol. 111, n° 30, p. E3091-E3100, juill. 2014, doi: 10.1073/pnas.1411679111.
- [92] A. D. Rhim *et al.*, « Stromal elements act to restrain, rather than support, pancreatic ductal adenocarcinoma », *Cancer Cell*, vol. 25, n° 6, p. 735-747, juin 2014, doi: 10.1016/j.ccr.2014.04.021.
- [93] P. P. Provenzano et S. R. Hingorani, « Hyaluronan, fluid pressure, and stromal resistance in pancreas cancer », *Br J Cancer*, vol. 108, n° 1, p. 1-8, janv. 2013, doi: 10.1038/bjc.2012.569.
- [94] S. H. Lee *et al.*, « Shear-wave elastographic features of breast cancers: comparison with mechanical elasticity and histopathologic characteristics », *Invest Radiol*, vol. 49, n° 3, p. 147-155, mars 2014, doi: 10.1097/RLI.0000000000000006.

- [95] B. C. Özdemir *et al.*, « Depletion of Carcinoma-Associated Fibroblasts and Fibrosis Induces Immunosuppression and Accelerates Pancreas Cancer with Diminished Survival », *Cancer Cell*, vol. 25, n° 6, p. 719-734, juin 2014, doi: 10.1016/j.ccr.2014.04.005.
- [96] N. Rath *et al.*, « ROCK signaling promotes collagen remodeling to facilitate invasive pancreatic ductal adenocarcinoma tumor cell growth », *EMBO Mol Med*, vol. 9, n° 2, p. 198-218, févr. 2017, doi: 10.15252/emmm.201606743.
- [97] X.-D. Liu *et al.*, « Resistance to Antiangiogenic Therapy Is Associated with an Immunosuppressive Tumor Microenvironment in Metastatic Renal Cell Carcinoma », *Cancer Immunol Res*, vol. 3, n° 9, p. 1017-1029, sept. 2015, doi: 10.1158/2326-6066.CIR-14-0244.
- [98] I. Acerbi *et al.*, « Human Breast Cancer Invasion and Aggression Correlates with ECM Stiffening and Immune Cell Infiltration », *Integr Biol (Camb)*, vol. 7, n° 10, p. 1120-1134, oct. 2015, doi: 10.1039/c5ib00040h.
- [99] R. K. Jain, J. D. Martin, et T. Stylianopoulos, « The role of mechanical forces in tumor growth and therapy », *Annu Rev Biomed Eng*, vol. 16, p. 321-346, juill. 2014, doi: 10.1146/annurev-bioeng-071813-105259.
- [100] K. R. Levental *et al.*, « Matrix Crosslinking Forces Tumor Progression by Enhancing Integrin Signaling », *Cell*, vol. 139, n° 5, p. 891-906, nov. 2009, doi: 10.1016/j.cell.2009.10.027.
- [101] J. A. McCarroll *et al.*, « Role of pancreatic stellate cells in chemoresistance in pancreatic cancer », *Front Physiol*, vol. 5, avr. 2014, doi: 10.3389/fphys.2014.00141.
- [102] F. Gebauer, M. Kemper, G. Sauter, P. Prehm, et U. Schumacher, « Is hyaluronan deposition in the stroma of pancreatic ductal adenocarcinoma of prognostic significance? », *PLoS One*, vol. 12, n° 6, p. e0178703, 2017, doi: 10.1371/journal.pone.0178703.
- [103] M. A. Jacobetz *et al.*, « Hyaluronan impairs vascular function and drug delivery in a mouse model of pancreatic cancer », *Gut*, vol. 62, n° 1, p. 112-120, janv. 2013, doi: 10.1136/gutjnl-2012-302529.
- [104] S. P. Hong, J. Wen, S. Bang, S. Park, et S. Y. Song, « CD44-positive cells are responsible for gemcitabine resistance in pancreatic cancer cells », *Int J Cancer*, vol. 125, n° 10, p. 2323-2331, nov. 2009, doi: 10.1002/ijc.24573.
- [105] H.-Y. Liu, M. Korc, et C.-C. Lin, « Biomimetic and enzyme-responsive dynamic hydrogels for studying cell-matrix interactions in pancreatic ductal adenocarcinoma », *Biomaterials*, vol. 160, p. 24-36, avr. 2018, doi: 10.1016/j.biomaterials.2018.01.012.
- [106] D. Duscher *et al.*, « Mechanotransduction and fibrosis », *J Biomech*, vol. 47, n° 9, p. 1997-2005, juin 2014, doi: 10.1016/j.jbiomech.2014.03.031.
- [107] H. Jiang *et al.*, « Targeting focal adhesion kinase renders pancreatic cancers responsive to checkpoint immunotherapy », *Nat Med*, vol. 22, n° 8, p. 851-860, 2016, doi: 10.1038/nm.4123.

- [108] C. R. Drifka *et al.*, « Highly aligned stromal collagen is a negative prognostic factor following pancreatic ductal adenocarcinoma resection », *Oncotarget*, vol. 7, n° 46, p. 76197-76213, oct. 2016, doi: 10.18632/oncotarget.12772.
- [109] S. Ramaswamy, K. N. Ross, E. S. Lander, et T. R. Golub, « A molecular signature of metastasis in primary solid tumors », *Nat Genet*, vol. 33, n° 1, p. 49-54, janv. 2003, doi: 10.1038/ng1060.
- [110] A. V. Nguyen *et al.*, « Stiffness of pancreatic cancer cells is associated with increased invasive potential », *Integr Biol (Camb)*, vol. 8, n° 12, p. 1232-1245, déc. 2016, doi: 10.1039/c6ib00135a.
- [111] G. Weder *et al.*, « Increased plasticity of the stiffness of melanoma cells correlates with their acquisition of metastatic properties », *Nanomedicine*, vol. 10, n° 1, p. 141-148, janv. 2014, doi: 10.1016/j.nano.2013.07.007.
- [112] J. Rother, H. Nöding, I. Mey, et A. Janshoff, « Atomic force microscopy-based microrheology reveals significant differences in the viscoelastic response between malign and benign cell lines », *Open Biology*, vol. 4, n° 5, p. 140046, doi: 10.1098/rsob.140046.
- [113] D. T. Butcher, T. Alliston, et V. M. Weaver, « A tense situation: forcing tumour progression », *Nat Rev Cancer*, vol. 9, n° 2, p. 108-122, févr. 2009, doi: 10.1038/nrc2544.
- [114] M. J. Paszek et V. M. Weaver, « The tension mounts: mechanics meets morphogenesis and malignancy », *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, vol. 9, n° 4, p. 325-342, oct. 2004, doi: 10.1007/s10911-004-1404-x.
- [115] C. Voutouri, C. Polydorou, P. Papageorgis, V. Gkretsi, et T. Stylianopoulos, « Hyaluronan-Derived Swelling of Solid Tumors, the Contribution of Collagen and Cancer Cells, and Implications for Cancer Therapy », *Neoplasia*, vol. 18, n° 12, p. 732-741, déc. 2016, doi: 10.1016/j.neo.2016.10.001.
- [116] T. Stylianopoulos *et al.*, « Causes, consequences, and remedies for growth-induced solid stress in murine and human tumors », *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 109, n° 38, p. 15101-15108, sept. 2012, doi: 10.1073/pnas.1213353109.
- [117] D. J. McGrail *et al.*, « Alterations in ovarian cancer cell adhesion drive taxol resistance by increasing microtubule dynamics in a FAK-dependent manner », *Sci Rep*, vol. 5, p. 9529, avr. 2015, doi: 10.1038/srep09529.
- [118] H. T. Nia *et al.*, « Solid stress and elastic energy as measures of tumour mechanopathology », *Nat Biomed Eng*, vol. 1, 2016, doi: 10.1038/s41551-016-0004.
- [119] T. Stylianopoulos, J. D. Martin, M. Snuderl, F. Mpekris, S. R. Jain, et R. K. Jain, « Coevolution of solid stress and interstitial fluid pressure in tumors during progression: implications for vascular collapse », *Cancer Res*, vol. 73, n° 13, p. 3833-3841, juill. 2013, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-4521.
- [120] M. Kalli et T. Stylianopoulos, « Defining the Role of Solid Stress and Matrix Stiffness in Cancer Cell Proliferation and Metastasis », *Front. Oncol.*, vol. 8, p. 55, mars 2018, doi: 10.3389/fonc.2018.00055.
- [121] C. S. Chen, « Mechanotransduction – a field pulling together? », *Journal of Cell Science*, vol. 121, n° 20, p. 3285-3292, oct. 2008, doi: 10.1242/jcs.023507.

- [122] C. De Pascalis et S. Etienne-Manneville, « Single and collective cell migration: the mechanics of adhesions », *Mol Biol Cell*, vol. 28, n° 14, p. 1833-1846, juill. 2017, doi: 10.1091/mbc.E17-03-0134.
- [123] W. J. Polacheck et C. S. Chen, « Measuring cell-generated forces: a guide to the available tools », *Nat Methods*, vol. 13, n° 5, p. 415-423, 28 2016, doi: 10.1038/nmeth.3834.
- [124] A. Rubiano *et al.*, « Viscoelastic properties of human pancreatic tumors and in vitro constructs to mimic mechanical properties », *Acta Biomaterialia*, vol. 67, p. 331-340, févr. 2018, doi: 10.1016/j.actbio.2017.11.037.
- [125] L. T. Baxter et R. K. Jain, « Transport of fluid and macromolecules in tumors. I. Role of interstitial pressure and convection », *Microvascular Research*, vol. 37, n° 1, p. 77-104, janv. 1989, doi: 10.1016/0026-2862(89)90074-5.
- [126] J. R. Levick, « Flow through interstitium and other fibrous matrices », *Q J Exp Physiol*, vol. 72, n° 4, p. 409-437, oct. 1987, doi: 10.1113/expphysiol.1987.sp003085.
- [127] P. A. Netti, D. A. Berk, M. A. Swartz, A. J. Grodzinsky, et R. K. Jain, « Role of extracellular matrix assembly in interstitial transport in solid tumors », *Cancer Res*, vol. 60, n° 9, p. 2497-2503, mai 2000.
- [128] R. K. Jain, « Transport of Molecules in the Tumor Interstitium: A Review », p. 14.
- [129] L. J. Liu et M. Schlessinger, « Interstitial hydraulic conductivity and interstitial fluid pressure for avascular or poorly vascularized tumors », *J Theor Biol*, vol. 380, p. 1-8, sept. 2015, doi: 10.1016/j.jtbi.2015.05.012.
- [130] E. A. Swabb, J. Wei, et P. M. Gullino, « Diffusion and Convection in Normal and Neoplastic Tissues », *Cancer Res*, vol. 34, n° 10, p. 2814-2822, oct. 1974.
- [131] J. L. Bert et I. Fatt, « Relation of Water Transport to Water Content in Swelling Biological Membranes », in *Surface Chemistry of Biological Systems: Proceedings of the American Chemical Society Symposium on Surface Chemistry of Biological Systems held in New York City September 11–12, 1969*, M. Blank, Éd. Boston, MA: Springer US, 1970, p. 287-294.
- [132] J. H. Ali, W. B. Wang, M. Zevallos, et R. R. Alfano, « Near infrared spectroscopy and imaging to probe differences in water content in normal and cancer human prostate tissues », *Technol Cancer Res Treat*, vol. 3, n° 5, p. 491-497, oct. 2004, doi: 10.1177/153303460400300510.
- [133] I. C. Kiricuta et V. Simplăceanu, « Tissue water content and nuclear magnetic resonance in normal and tumor tissues », *Cancer Res*, vol. 35, n° 5, p. 1164-1167, mai 1975.
- [134] K. Nowak *et al.*, « Intraoperative lung edema monitoring by microwave reflectometry », *Interact CardioVasc Thorac Surg*, vol. 12, n° 4, p. 540-544, avr. 2011, doi: 10.1510/icvts.2010.243691.
- [135] M. Soltani et P. Chen, « Numerical Modeling of Fluid Flow in Solid Tumors », *PLOS ONE*, vol. 6, n° 6, p. e20344, juin 2011, doi: 10.1371/journal.pone.0020344.
- [136] R. K. Jain, R. T. Tong, et L. L. Munn, « Effect of vascular normalization by antiangiogenic therapy on interstitial hypertension, peritumor edema, and

lymphatic metastasis: insights from a mathematical model », *Cancer Res*, vol. 67, n° 6, p. 2729-2735, mars 2007, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-4102.

- [137] C. Phipps et M. Kohandel, « Mathematical Model of the Effect of Interstitial Fluid Pressure on Angiogenic Behavior in Solid Tumors », *Computational and Mathematical Methods in Medicine*, sept. 07, 2011. <https://www.hindawi.com/journals/cmmm/2011/843765/> (consulté le oct. 22, 2020).
- [138] G. Zhao *et al.*, « Numerical simulation of blood flow and interstitial fluid pressure in solid tumor microcirculation based on tumor-induced angiogenesis », *Acta Mech Sin*, vol. 23, n° 5, p. 477-483, oct. 2007, doi: 10.1007/s10409-007-0098-x.
- [139] R. K. Jain et L. T. Baxter, « Mechanisms of heterogeneous distribution of monoclonal antibodies and other macromolecules in tumors: significance of elevated interstitial pressure », *Cancer Res*, vol. 48, n° 24 Pt 1, p. 7022-7032, déc. 1988.
- [140] E. R. Zakaria, J. Lofthouse, et M. F. Flessner, « In vivo hydraulic conductivity of muscle: effects of hydrostatic pressure », *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, vol. 273, n° 6, p. H2774-H2782, déc. 1997, doi: 10.1152/ajpheart.1997.273.6.H2774.
- [141] X. Y. Zhang, J. Luck, M. W. Dewhirst, et F. Yuan, « Interstitial hydraulic conductivity in a fibrosarcoma », *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, vol. 279, n° 6, p. H2726-2734, déc. 2000, doi: 10.1152/ajpheart.2000.279.6.H2726.
- [142] A. Bottaro et T. Ansaldi, « On the infusion of a therapeutic agent into a solid tumor modeled as a poroelastic medium », *J Biomech Eng*, vol. 134, n° 8, p. 084501, août 2012, doi: 10.1115/1.4007174.
- [143] W. Yao, Y. Li, et G. Ding, « Interstitial Fluid Flow: The Mechanical Environment of Cells and Foundation of Meridians », *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, déc. 17, 2012. <https://www.hindawi.com/journals/ecam/2012/853516/> (consulté le oct. 21, 2020).
- [144] C. C. DuFort *et al.*, « Interstitial Pressure in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Is Dominated by a Gel-Fluid Phase », *Biophysical Journal*, vol. 110, n° 9, p. 2106-2119, mai 2016, doi: 10.1016/j.bpj.2016.03.040.
- [145] Boardman Kendrick C. et Swartz Melody A., « Interstitial Flow as a Guide for Lymphangiogenesis », *Circulation Research*, vol. 92, n° 7, p. 801-808, avr. 2003, doi: 10.1161/01.RES.0000065621.69843.49.
- [146] H. Dafni, T. Israely, Z. M. Bhujwalla, L. E. Benjamin, et M. Neeman, « Overexpression of Vascular Endothelial Growth Factor 165 Drives Peritumor Interstitial Convection and Induces Lymphatic Drain: Magnetic Resonance Imaging, Confocal Microscopy, and Histological Tracking of Triple-labeled Albumin », *Cancer Res*, vol. 62, n° 22, p. 6731-6739, nov. 2002.
- [147] S. R. Chary et R. K. Jain, « Direct measurement of interstitial convection and diffusion of albumin in normal and neoplastic tissues by fluorescence photobleaching », *PNAS*, vol. 86, n° 14, p. 5385-5389, juill. 1989, doi: 10.1073/pnas.86.14.5385.
- [148] C.-H. Heldin, K. Rubin, K. Pietras, et A. Ostman, « High interstitial fluid pressure - an obstacle in cancer therapy », *Nat Rev Cancer*, vol. 4, n° 10, p. 806-813, oct. 2004, doi: 10.1038/nrc1456.

- [149] B. D. Curti *et al.*, « Interstitial pressure of subcutaneous nodules in melanoma and lymphoma patients: changes during treatment », *Cancer Res*, vol. 53, n° 10 Suppl, p. 2204-2207, mai 1993.
- [150] M. Hofmann *et al.*, « Lowering of tumor interstitial fluid pressure reduces tumor cell proliferation in a xenograft tumor model », *Neoplasia*, vol. 8, n° 2, p. 89-95, févr. 2006, doi: 10.1593/neo.05469.
- [151] M. Leunig *et al.*, « Interstitial fluid pressure in solid tumors following hyperthermia: possible correlation with therapeutic response », *Cancer Res*, vol. 52, n° 2, p. 487-490, janv. 1992.
- [152] M. D. Nieskoski *et al.*, « Collagen Complexity Spatially Defines Microregions of Total Tissue Pressure in Pancreatic Cancer », *Sci Rep*, vol. 7, n° 1, p. 10093, déc. 2017, doi: 10.1038/s41598-017-10671-w.
- [153] T. G. Simonsen, J.-V. Gaustad, M. N. Leinaas, et E. K. Rofstad, « High Interstitial Fluid Pressure Is Associated with Tumor-Line Specific Vascular Abnormalities in Human Melanoma Xenografts », *PLOS ONE*, vol. 7, n° 6, p. e40006, juin 2012, doi: 10.1371/journal.pone.0040006.
- [154] H. Wiig et G. Gadeholt, « Interstitial fluid pressure and hemodynamics in a sarcoma implanted in the rat tail », *Microvascular Research*, vol. 29, n° 2, p. 176-189, mars 1985, doi: 10.1016/0026-2862(85)90015-9.
- [155] R. A. Brace et A. C. Guyton, « Interstitial fluid pressure: Capsule, free fluid, gel fluid, and gel absorption pressure in subcutaneous tissue », *Microvascular Research*, vol. 18, n° 2, p. 217-228, sept. 1979, doi: 10.1016/0026-2862(79)90030-X.
- [156] J. Hunger, A. Bernecker, H. J. Bakker, M. Bonn, et R. P. Richter, « Hydration Dynamics of Hyaluronan and Dextran », *Biophysical Journal*, vol. 103, n° 1, p. L10-L12, juill. 2012, doi: 10.1016/j.bpj.2012.05.028.
- [157] A. Průšová, F. J. Vergeldt, et J. Kučerík, « Influence of water content and drying on the physical structure of native hyaluronan », *Carbohydrate Polymers*, vol. 95, n° 1, p. 515-521, juin 2013, doi: 10.1016/j.carbpol.2013.03.031.
- [158] J. Hoarau-Véchet, A. Rafii, C. Touboul, et J. Pasquier, « Halfway between 2D and Animal Models: Are 3D Cultures the Ideal Tool to Study Cancer-Microenvironment Interactions? », *Int J Mol Sci*, vol. 19, n° 1, janv. 2018, doi: 10.3390/ijms19010181.
- [159] E. Fennema, N. Rivron, J. Rouwkema, C. van Blitterswijk, et J. de Boer, « Spheroid culture as a tool for creating 3D complex tissues », *Trends Biotechnol*, vol. 31, n° 2, p. 108-115, févr. 2013, doi: 10.1016/j.tibtech.2012.12.003.
- [160] J. A. Hickman *et al.*, « Three-dimensional models of cancer for pharmacology and cancer cell biology: capturing tumor complexity in vitro/ex vivo », *Biotechnol J*, vol. 9, n° 9, p. 1115-1128, sept. 2014, doi: 10.1002/biot.201300492.
- [161] N. S. Joshi *et al.*, « Regulatory T cells in tumor-associated tertiary lymphoid structures suppress anti-tumor T cell responses », *Immunity*, vol. 43, n° 3, p. 579-590, sept. 2015, doi: 10.1016/j.immuni.2015.08.006.

- [162] D. Loessner *et al.*, « A 3D tumor microenvironment regulates cell proliferation, peritoneal growth and expression patterns », *Biomaterials*, vol. 190-191, p. 63-75, 2019, doi: 10.1016/j.biomaterials.2018.10.014.
- [163] S. J. Coleman *et al.*, « Pancreatic cancer organotypics: High throughput, preclinical models for pharmacological agent evaluation », *World J Gastroenterol*, vol. 20, n° 26, p. 8471-8481, juill. 2014, doi: 10.3748/wjg.v20.i26.8471.
- [164] M. Cekanova et K. Rathore, « Animal models and therapeutic molecular targets of cancer: utility and limitations », *Drug Des Devel Ther*, vol. 8, p. 1911-1921, 2014, doi: 10.2147/DDDT.S49584.
- [165] B. A. Hassell *et al.*, « Human Organ Chip Models Recapitulate Orthotopic Lung Cancer Growth, Therapeutic Responses, and Tumor Dormancy In Vitro », *Cell Rep*, vol. 21, n° 2, p. 508-516, oct. 2017, doi: 10.1016/j.celrep.2017.09.043.
- [166] B. Zhang, A. Korolj, B. F. L. Lai, et M. Radisic, « Advances in organ-on-a-chip engineering », *Nature Reviews Materials*, vol. 3, n° 8, Art. n° 8, août 2018, doi: 10.1038/s41578-018-0034-7.
- [167] A. Sontheimer-Phelps, B. A. Hassell, et D. E. Ingber, « Modelling cancer in microfluidic human organs-on-chips », *Nat Rev Cancer*, vol. 19, n° 2, p. 65-81, févr. 2019, doi: 10.1038/s41568-018-0104-6.
- [168] K. E. Sung et D. J. Beebe, « Microfluidic 3D models of cancer », *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 79-80, p. 68-78, déc. 2014, doi: 10.1016/j.addr.2014.07.002.
- [169] S. N. Bhatia et D. E. Ingber, « Microfluidic organs-on-chips », *Nat Biotechnol*, vol. 32, n° 8, p. 760-772, août 2014, doi: 10.1038/nbt.2989.
- [170] Y.-A. Chen *et al.*, « Generation of oxygen gradients in microfluidic devices for cell culture using spatially confined chemical reactions », *Lab Chip*, vol. 11, n° 21, p. 3626, 2011, doi: 10.1039/c1lc20325h.
- [171] L. Ying *et al.*, « Cancer Associated Fibroblast-Derived Hepatocyte Growth Factor Inhibits the Paclitaxel-Induced Apoptosis of Lung Cancer A549 Cells by Up-Regulating the PI3K/Akt and GRP78 Signaling on a Microfluidic Platform », *PLoS One*, vol. 10, n° 6, juin 2015, doi: 10.1371/journal.pone.0129593.
- [172] J. Bai, T.-Y. Tu, C. Kim, J. P. Thiery, et R. D. Kamm, « Identification of drugs as single agents or in combination to prevent carcinoma dissemination in a microfluidic 3D environment », *Oncotarget*, vol. 6, n° 34, p. 36603-36614, oct. 2015.
- [173] Z. Xu *et al.*, « Application of a microfluidic chip-based 3D co-culture to test drug sensitivity for individualized treatment of lung cancer », *Biomaterials*, vol. 34, n° 16, p. 4109-4117, mai 2013, doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.02.045.
- [174] V. van Duinen *et al.*, « 96 perfusable blood vessels to study vascular permeability in vitro », *Scientific Reports*, vol. 7, n° 1, Art. n° 1, déc. 2017, doi: 10.1038/s41598-017-14716-y.
- [175] J. Pauty *et al.*, « A Vascular Endothelial Growth Factor-Dependent Sprouting Angiogenesis Assay Based on an In Vitro Human Blood Vessel Model for the Study of Anti-Angiogenic Drugs », *EBioMedicine*, vol. 27, p. 225-236, janv. 2018, doi: 10.1016/j.ebiom.2017.12.014.
- [176] M. J. Wilmer, C. P. Ng, H. L. Lanz, P. Vulto, L. Suter-Dick, et R. Masereeuw, « Kidney-on-a-Chip Technology for Drug-Induced Nephrotoxicity Screening »,

*Trends Biotechnol*, vol. 34, n° 2, p. 156-170, févr. 2016, doi: 10.1016/j.tibtech.2015.11.001.

- [177] C. Beaurivage *et al.*, « Development of a Gut-on-a-Chip Model for High Throughput Disease Modeling and Drug Discovery », *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 20, n° 22, Art. n° 22, janv. 2019, doi: 10.3390/ijms20225661.
- [178] M. Beer *et al.*, « A novel microfluidic 3D platform for culturing pancreatic ductal adenocarcinoma cells: comparison with in vitro cultures and in vivo xenografts », *Sci Rep*, vol. 7, n° 1, p. 1325, déc. 2017, doi: 10.1038/s41598-017-01256-8.
- [179] J.-H. Lee, S.-K. Kim, I. A. Khawar, S.-Y. Jeong, S. Chung, et H.-J. Kuh, « Microfluidic co-culture of pancreatic tumor spheroids with stellate cells as a novel 3D model for investigation of stroma-mediated cell motility and drug resistance », *J Exp Clin Cancer Res*, vol. 37, n° 1, p. 4, déc. 2018, doi: 10.1186/s13046-017-0654-6.
- [180] B. Kramer *et al.*, « Interstitial Flow Recapitulates Gemcitabine Chemoresistance in A 3D Microfluidic Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Model by Induction of Multidrug Resistance Proteins », *IJMS*, vol. 20, n° 18, p. 4647, sept. 2019, doi: 10.3390/ijms20184647.
- [181] K. Shik Mun *et al.*, « Patient-derived pancreas-on-a-chip to model cystic fibrosis-related disorders », *Nature Communications*, vol. 10, n° 1, Art. n° 1, juill. 2019, doi: 10.1038/s41467-019-11178-w.
- [182] V. van Duinen, S. J. Trietsch, J. Joore, P. Vulto, et T. Hankemeier, « Microfluidic 3D cell culture: from tools to tissue models », *Curr Opin Biotechnol*, vol. 35, p. 118-126, déc. 2015, doi: 10.1016/j.copbio.2015.05.002.
- [183] S. Bersini *et al.*, « A microfluidic 3D in vitro model for specificity of breast cancer metastasis to bone », *Biomaterials*, vol. 35, n° 8, p. 2454-2461, mars 2014, doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.11.050.
- [184] C. R. Drifka, K. W. Eliceiri, S. M. Weber, et W. J. Kao, « A bioengineered heterotypic stroma-cancer microenvironment model to study pancreatic ductal adenocarcinoma », *Lab Chip*, vol. 13, n° 19, p. 3965-3975, oct. 2013, doi: 10.1039/c3lc50487e.
- [185] C. R. Drifka, A. G. Loeffler, C. R. Esquibel, S. M. Weber, K. W. Eliceiri, et W. J. Kao, « Human pancreatic stellate cells modulate 3D collagen alignment to promote the migration of pancreatic ductal adenocarcinoma cells », *Biomed Microdevices*, vol. 18, n° 6, p. 105, déc. 2016, doi: 10.1007/s10544-016-0128-1.
- [186] D. Gioeli *et al.*, « Development of a multicellular pancreatic tumor microenvironment system using patient-derived tumor cells », *Lab Chip*, vol. 19, n° 7, p. 1193-1204, 2019, doi: 10.1039/C8LC00755A.
- [187] D.-H. T. Nguyen *et al.*, « A biomimetic pancreatic cancer on-chip reveals endothelial ablation via ALK7 signaling », *Sci. Adv.*, vol. 5, n° 8, p. eaav6789, août 2019, doi: 10.1126/sciadv.aav6789.
- [188] M. J. Bradney, S. M. Venis, Y. Yang, S. F. Konieczny, et B. Han, « A Biomimetic Tumor Model of Heterogeneous Invasion in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma », *Small*, vol. 16, n° 10, p. 1905500, mars 2020, doi: 10.1002/smll.201905500.

- [189] H. Cho, H.-Y. Kim, J. Y. Kang, et T. S. Kim, « How the capillary burst microvalve works », *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 306, n° 2, p. 379-385, févr. 2007, doi: 10.1016/j.jcis.2006.10.077.
- [190] C. P. Huang *et al.*, « Engineering microscale cellular niches for three-dimensional multicellular co-cultures », *Lab Chip*, vol. 9, n° 12, p. 1740, 2009, doi: 10.1039/b818401a.
- [191] M. Baydoun *et al.*, « An Interphase Microfluidic Culture System for the Study of Ex Vivo Intestinal Tissue », *Micromachines (Basel)*, vol. 11, n° 2, janv. 2020, doi: 10.3390/mi11020150.
- [192] V. S. Shirure *et al.*, « Tumor-on-a-chip platform to investigate progression and drug sensitivity in cell lines and patient-derived organoids », *Lab Chip*, vol. 18, n° 23, p. 3687-3702, 2018, doi: 10.1039/C8LC00596F.
- [193] Y.-H. Hsu, M. L. Moya, P. Abiri, C. C. W. Hughes, S. C. George, et A. P. Lee, « Full range physiological mass transport control in 3D tissue cultures », *Lab Chip*, vol. 13, n° 1, p. 81-89, janv. 2013, doi: 10.1039/c2lc40787f.
- [194] V. Serpooshan, T. M. Quinn, N. Muja, et S. N. Nazhat, « Hydraulic permeability of multilayered collagen gel scaffolds under plastic compression-induced unidirectional fluid flow », *Acta Biomaterialia*, vol. 9, n° 1, p. 4673-4680, janv. 2013, doi: 10.1016/j.actbio.2012.08.031.
- [195] E. Gentleman, E. A. Nauman, K. C. Dee, et G. A. Livesay, « Short collagen fibers provide control of contraction and permeability in fibroblast-seeded collagen gels », *Tissue Eng*, vol. 10, n° 3-4, p. 421-427, avr. 2004, doi: 10.1089/107632704323061780.
- [196] D. Huh *et al.*, « Microfabrication of human organs-on-chips », *Nat Protoc*, vol. 8, n° 11, p. 2135-2157, nov. 2013, doi: 10.1038/nprot.2013.137.
- [197] Y. Shin *et al.*, « Microfluidic assay for simultaneous culture of multiple cell types on surfaces or within hydrogels », *Nat Protoc*, vol. 7, n° 7, p. 1247-1259, juill. 2012, doi: 10.1038/nprot.2012.051.
- [198] F. E. M. Froeling *et al.*, « Organotypic Culture Model of Pancreatic Cancer Demonstrates that Stromal Cells Modulate E-Cadherin,  $\beta$ -Catenin, and Ezrin Expression in Tumor Cells », *The American Journal of Pathology*, vol. 175, n° 2, p. 636-648, août 2009, doi: 10.2353/ajpath.2009.090131.
- [199] A. A. Yunis, G. K. Arimura, et D. J. Russin, « Human pancreatic carcinoma (MIA PaCa-2) in continuous culture: sensitivity to asparaginase », *Int J Cancer*, vol. 19, n° 1, p. 128-135, janv. 1977, doi: 10.1002/ijc.2910190118.
- [200] M. Lieber, J. Mazzetta, W. Nelson-Rees, M. Kaplan, et G. Todaro, « Establishment of a continuous tumor-cell line (panc-1) from a human carcinoma of the exocrine pancreas », *Int J Cancer*, vol. 15, n° 5, p. 741-747, mai 1975, doi: 10.1002/ijc.2910150505.
- [201] R. Dahiya, K.-S. Kwak, J. C. Byrd, S. Ho, W.-H. Yoon, et Y. S. Kim, « Mucin Synthesis and Secretion in Various Human Epithelial Cancer Cell Lines That Express the MUC-1 Mucin Gene », *Cancer Res*, vol. 53, n° 6, p. 1437-1443, mars 1993.

- [202] T. E. Meigs, M. Fedor-Chaiken, D. D. Kaplan, R. Brackenbury, et P. J. Casey, « Galpha12 and Galpha13 negatively regulate the adhesive functions of cadherin », *J Biol Chem*, vol. 277, n° 27, p. 24594-24600, juill. 2002, doi: 10.1074/jbc.M201984200.
- [203] J. M. Dave et K. J. Bayless, « Vimentin as an integral regulator of cell adhesion and endothelial sprouting », *Microcirculation*, vol. 21, n° 4, p. 333-344, mai 2014, doi: 10.1111/micc.12111.
- [204] M. Alonso-Nocelo, T. M. Raimondo, K. H. Vining, R. López-López, M. de la Fuente, et D. J. Mooney, « Matrix stiffness and tumor-associated macrophages modulate epithelial to mesenchymal transition of human adenocarcinoma cells », *Biofabrication*, vol. 10, n° 3, p. 035004, 28 2018, doi: 10.1088/1758-5090/aaafbc.
- [205] A. J. Rice *et al.*, « Matrix stiffness induces epithelial–mesenchymal transition and promotes chemoresistance in pancreatic cancer cells », *Oncogenesis*, vol. 6, n° 7, Art. n° 7, juill. 2017, doi: 10.1038/oncsis.2017.54.
- [206] S. S. Soofi, J. A. Last, S. J. Liliensiek, P. F. Nealey, et C. J. Murphy, « The elastic modulus of Matrigel™ as determined by atomic force microscopy », *J Struct Biol*, vol. 167, n° 3, p. 216-219, sept. 2009, doi: 10.1016/j.jsb.2009.05.005.
- [207] J. Joshi, G. Mahajan, et C. R. Kothapalli, « Three-dimensional collagenous niche and azacytidine selectively promote time-dependent cardiomyogenesis from human bone marrow-derived MSC spheroids », *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 115, n° 8, p. 2013-2026, août 2018, doi: 10.1002/bit.26714.
- [208] S.-Y. Jeong, J.-H. Lee, Y. Shin, S. Chung, et H.-J. Kuh, « Co-Culture of Tumor Spheroids and Fibroblasts in a Collagen Matrix-Incorporated Microfluidic Chip Mimics Reciprocal Activation in Solid Tumor Microenvironment », *PLoS ONE*, vol. 11, n° 7, p. e0159013, juill. 2016, doi: 10.1371/journal.pone.0159013.
- [209] S. L. Marasso *et al.*, « Optimized design and fabrication of a microfluidic platform to study single cells and multicellular aggregates in 3D », *Microfluid Nanofluid*, vol. 21, n° 2, p. 29, févr. 2017, doi: 10.1007/s10404-017-1872-0.
- [210] K. Domansky *et al.*, « SEBS elastomers for fabrication of microfluidic devices with reduced drug absorption by injection molding and extrusion », *Microfluid Nanofluid*, vol. 21, n° 6, p. 107, juin 2017, doi: 10.1007/s10404-017-1941-4.
- [211] C. Chi *et al.*, « High-Throughput Tumor-on-a-Chip Platform to Study Tumor–Stroma Interactions and Drug Pharmacokinetics », *Adv. Healthcare Mater.*, p. 2000880, sept. 2020, doi: 10.1002/adhm.202000880.
- [212] M. Danoy, « Development of a physiologically-relevant in-vitro microfluidic model for monitoring of pancreatic cancer cells interactions with the liver », These de doctorat, Lille 1, 2017.
- [213] E. Tomás-Bort, M. Kieler, S. Sharma, J. B. Candido, et D. Loessner, « 3D approaches to model the tumor microenvironment of pancreatic cancer », *Theranostics*, vol. 10, n° 11, p. 5074-5089, avr. 2020, doi: 10.7150/thno.42441.
- [214] R. Jesnowski *et al.*, « Immortalization of pancreatic stellate cells as an in vitro model of pancreatic fibrosis: deactivation is induced by matrigel and N-acetylcysteine », *Lab Invest*, vol. 85, n° 10, p. 1276-1291, oct. 2005, doi: 10.1038/labinvest.3700329.

- [215] E. L. Deer *et al.*, « Phenotype and Genotype of Pancreatic Cancer Cell Lines », *Pancreas*, vol. 39, n° 4, p. 425-435, mai 2010, doi: 10.1097/MPA.0b013e3181c15963.
- [216] E. Toyoda *et al.*, « Analysis of E-, N-Cadherin,  $\alpha$ -,  $\beta$ -, and  $\gamma$ -Catenin Expression in Human Pancreatic Carcinoma Cell Lines », *Pancreas*, vol. 30, n° 2, p. 168-173, mars 2005, doi: 10.1097/01.mpa.0000148514.69873.85.
- [217] Y. Fujii-Nishimura *et al.*, « Mesenchymal–epithelial transition of pancreatic cancer cells at perineural invasion sites is induced by Schwann cells », *Pathology International*, vol. 68, n° 4, p. 214-223, 2018, doi: 10.1111/pin.12641.
- [218] A. V. Salnikov *et al.*, « Hypoxia Induces EMT in Low and Highly Aggressive Pancreatic Tumor Cells but Only Cells with Cancer Stem Cell Characteristics Acquire Pronounced Migratory Potential », *PLoS One*, vol. 7, n° 9, sept. 2012, doi: 10.1371/journal.pone.0046391.
- [219] K. A. Maupin *et al.*, « Glycogene expression alterations associated with pancreatic cancer epithelial-mesenchymal transition in complementary model systems », *PLoS One*, vol. 5, n° 9, p. e13002, sept. 2010, doi: 10.1371/journal.pone.0013002.
- [220] Y. Ben-Harosh, M. Anosov, H. Salem, Y. Yatchenko, et R. Birk, « Pancreatic stellate cell activation is regulated by fatty acids and ER stress », *Exp Cell Res*, vol. 359, n° 1, p. 76-85, 01 2017, doi: 10.1016/j.yexcr.2017.08.007.
- [221] Z. Niknami, A. Muhammadnejad, A. Ebrahimi, Z. Harsani, et R. Shirkoohi, « Significance of E-cadherin and Vimentin as epithelial-mesenchymal transition markers in colorectal carcinoma prognosis », *EXCLI J*, vol. 19, p. 917-926, juin 2020, doi: 10.17179/excli2020-1946.
- [222] N.-H. Myong, « Loss of E-cadherin and Acquisition of Vimentin in Epithelial-Mesenchymal Transition are Noble Indicators of Uterine Cervix Cancer Progression », *Korean J Pathol*, vol. 46, n° 4, p. 341-348, août 2012, doi: 10.4132/KoreanJPathol.2012.46.4.341.
- [223] M.-C. Liu *et al.*, « Electrofluidic pressure sensor embedded microfluidic device: a study of endothelial cells under hydrostatic pressure and shear stress combinations », *Lab Chip*, vol. 13, n° 9, p. 1743-1753, avr. 2013, doi: 10.1039/C3LC41414K.
- [224] R. Li *et al.*, « Microvalve controlled multi-functional microfluidic chip for divisional cell co-culture », *Analytical Biochemistry*, vol. 539, p. 48-53, déc. 2017, doi: 10.1016/j.ab.2017.10.008.
- [225] C. T. Culbertson, S. C. Jacobson, et J. Michael Ramsey, « Diffusion coefficient measurements in microfluidic devices », *Talanta*, vol. 56, n° 2, p. 365-373, févr. 2002, doi: 10.1016/s0039-9140(01)00602-6.
- [226] T. Kihara, J. Ito, et J. Miyake, « Measurement of Biomolecular Diffusion in Extracellular Matrix Condensed by Fibroblasts Using Fluorescence Correlation Spectroscopy », *PLoS One*, vol. 8, n° 11, nov. 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0082382.
- [227] H. C. Ishikawa-Ankerhold, R. Ankerhold, et G. P. C. Drummen, « Advanced Fluorescence Microscopy Techniques—FRAP, FLIP, FLAP, FRET and FLIM »,

*Molecules*, vol. 17, n° 4, p. 4047-4132, avr. 2012, doi: 10.3390/molecules17044047.

- [228] A. J. Primeau, A. Rendon, D. Hedley, L. Lilge, et I. F. Tannock, « The Distribution of the Anticancer Drug Doxorubicin in Relation to Blood Vessels in Solid Tumors », *Clin Cancer Res*, vol. 11, n° 24, p. 8782-8788, déc. 2005, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-05-1664.
- [229] M. W. Dewhirst, Y. Cao, et B. Moeller, « Cycling hypoxia and free radicals regulate angiogenesis and radiotherapy response », *Nature Reviews Cancer*, vol. 8, n° 6, Art. n° 6, juin 2008, doi: 10.1038/nrc2397.
- [230] W. R. Wilson et M. P. Hay, « Targeting hypoxia in cancer therapy », *Nature Reviews Cancer*, vol. 11, n° 6, Art. n° 6, juin 2011, doi: 10.1038/nrc3064.
- [231] R. H. Thomlinson et L. H. Gray, « The histological structure of some human lung cancers and the possible implications for radiotherapy », *Br J Cancer*, vol. 9, n° 4, p. 539-549, déc. 1955, doi: 10.1038/bjc.1955.55.
- [232] M. Nebel, S. Grütze, N. Diab, A. Schulte, et W. Schuhmann, « Visualization of oxygen consumption of single living cells by scanning electrochemical microscopy: the influence of the faradaic tip reaction », *Angew Chem Int Ed Engl*, vol. 52, n° 24, p. 6335-6338, juin 2013, doi: 10.1002/anie.201301098.
- [233] C. S. Santos, A. J. Kowaltowski, et M. Bertotti, « Single Cell Oxygen Mapping (SCOM) by Scanning Electrochemical Microscopy Uncovers Heterogeneous Intracellular Oxygen Consumption », *Scientific Reports*, vol. 7, n° 1, Art. n° 1, sept. 2017, doi: 10.1038/s41598-017-11956-w.
- [234] N. Yamamoto *et al.*, « Measurement of glucose uptake in cultured cells », *Curr Protoc Pharmacol*, vol. Chapter 12, p. Unit 12.14.1-22, déc. 2011, doi: 10.1002/0471141755.ph1214s55.
- [235] C. Zou, Y. Wang, et Z. Shen, « 2-NBDG as a fluorescent indicator for direct glucose uptake measurement », *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, vol. 64, n° 3, p. 207-215, sept. 2005, doi: 10.1016/j.jbbm.2005.08.001.
- [236] Z.-Y. Li *et al.*, « Visualization of GLUT1 Trafficking in Live Cancer Cells by the Use of a Dual-Fluorescence Reporter », *ACS Omega*, vol. 5, n° 26, p. 15911-15921, juill. 2020, doi: 10.1021/acsomega.0c01054.
- [237] S. E. Eklund *et al.*, « Metabolic Discrimination of Select List Agents by Monitoring Cellular Responses in a Multianalyte Microphysiometer », *Sensors (Basel)*, vol. 9, n° 3, p. 2117-2133, mars 2009, doi: 10.3390/s90302117.
- [238] J. M. Rutkowski et M. A. Swartz, « A driving force for change: interstitial flow as a morphoregulator », *Trends Cell Biol*, vol. 17, n° 1, p. 44-50, janv. 2007, doi: 10.1016/j.tcb.2006.11.007.
- [239] R. K. Jain, P. Au, J. Tam, D. G. Duda, et D. Fukumura, « Engineering vascularized tissue », *Nature Biotechnology*, vol. 23, n° 7, Art. n° 7, juill. 2005, doi: 10.1038/nbt0705-821.
- [240] W. Voigt, S. Matsui, M. B. Yin, W. C. Burhans, H. Minderman, et Y. M. Rustum, « Topoisomerase-I inhibitor SN-38 can induce DNA damage and chromosomal aberrations independent from DNA synthesis », *Anticancer Res*, vol. 18, n° 5A, p. 3499-3505, oct. 1998.

- [241] L. Deyme, D. Barbolosi, et F. Gattacceca, « Population pharmacokinetics of FOLFIRINOX: a review of studies and parameters », *Cancer Chemother Pharmacol*, vol. 83, n° 1, p. 27-42, 2019, doi: 10.1007/s00280-018-3722-5.
- [242] F. M. de Man, A. K. L. Goey, R. H. N. van Schaik, R. H. J. Mathijssen, et S. Bins, « Individualization of Irinotecan Treatment: A Review of Pharmacokinetics, Pharmacodynamics, and Pharmacogenetics », *Clin Pharmacokinet*, vol. 57, n° 10, p. 1229-1254, 2018, doi: 10.1007/s40262-018-0644-7.
- [243] A. Vienot *et al.*, « FOLFOXIRI vs FOLFIRINOX as first-line chemotherapy in patients with advanced pancreatic cancer: A population-based cohort study », *World J Gastrointest Oncol*, vol. 12, n° 3, p. 332-346, mars 2020, doi: 10.4251/wjgo.v12.i3.332.
- [244] B. Wang, J. Kohli, et M. Demaria, « Senescent Cells in Cancer Therapy: Friends or Foes? », *Trends in Cancer*, vol. 6, n° 10, p. 838-857, oct. 2020, doi: 10.1016/j.trecan.2020.05.004.
- [245] M. V. Shirmanova *et al.*, « Chemotherapy with cisplatin: insights into intracellular pH and metabolic landscape of cancer cells in vitro and in vivo », *Scientific Reports*, vol. 7, n° 1, Art. n° 1, août 2017, doi: 10.1038/s41598-017-09426-4.
- [246] Y. Cui *et al.*, « Genetically defined subsets of human pancreatic cancer demonstrate unique in vitro chemosensitivity », *Clin Cancer Res*, vol. 18, n° 23, p. 6519-6530, déc. 2012, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-0827.
- [247] S. Ahmed, A.-D. Bradshaw, S. Gera, M. Z. Dewan, et R. Xu, « The TGF- $\beta$ /Smad4 Signaling Pathway in Pancreatic Carcinogenesis and Its Clinical Significance », *J Clin Med*, vol. 6, n° 1, janv. 2017, doi: 10.3390/jcm6010005.
- [248] N. Jonckheere *et al.*, « A role for human MUC4 mucin gene, the ErbB2 ligand, as a target of TGF- $\beta$  in pancreatic carcinogenesis », *Oncogene*, vol. 23, n° 34, Art. n° 34, juill. 2004, doi: 10.1038/sj.onc.1207769.
- [249] G. Subramanian *et al.*, « Targeting Endogenous Transforming Growth Factor  $\beta$  Receptor Signaling in SMAD4-Deficient Human Pancreatic Carcinoma Cells Inhibits Their Invasive Phenotype 1 », *Cancer Res*, vol. 64, n° 15, p. 5200-5211, août 2004, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-0018.
- [250] M. C. Daroqui, P. Vazquez, E. B. de Kier Joffé, A. V. Bakin, et L. I. Puricelli, « TGF- $\beta$  autocrine pathway and MAPK signaling promote cell invasiveness and in vivo mammary adenocarcinoma tumor progression », *Oncol Rep*, vol. 28, n° 2, p. 567-575, août 2012, doi: 10.3892/or.2012.1813.
- [251] H. Ma *et al.*, « Activated hepatic stellate cells promote epithelial-to-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma through transglutaminase 2-induced pseudohypoxia », *Communications Biology*, vol. 1, n° 1, Art. n° 1, oct. 2018, doi: 10.1038/s42003-018-0177-5.
- [252] K. Kikuta *et al.*, « Pancreatic stellate cells promote epithelial-mesenchymal transition in pancreatic cancer cells », *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 403, n° 3-4, p. 380-384, déc. 2010, doi: 10.1016/j.bbrc.2010.11.040.
- [253] E. Karnevi, A. H. Rosendahl, K. S. Hilmersson, M. A. Saleem, et R. Andersson, « Impact by pancreatic stellate cells on epithelial-mesenchymal transition and pancreatic cancer cell invasion: Adding a third dimension in vitro », *Exp Cell Res*, vol. 346, n° 2, p. 206-215, 15 2016, doi: 10.1016/j.yexcr.2016.07.017.

- [254] C. Neuzillet *et al.*, « Targeting the TGF $\beta$  pathway for cancer therapy », *Pharmacology & Therapeutics*, vol. 147, p. 22-31, mars 2015, doi: 10.1016/j.pharmthera.2014.11.001.
- [255] A. S. Piotrowski-Daspit, J. Tien, et C. M. Nelson, « Interstitial fluid pressure regulates collective invasion in engineered human breast tumors *via* Snail, vimentin, and E-cadherin », *Integrative Biology*, vol. 8, n<sup>o</sup> 3, p. 319-331, mars 2016, doi: 10.1039/c5ib00282f.
- [256] X. Wu *et al.*, « IL-6 secreted by cancer-associated fibroblasts promotes epithelial-mesenchymal transition and metastasis of gastric cancer via JAK2/STAT3 signaling pathway », *Oncotarget*, vol. 8, n<sup>o</sup> 13, p. 20741-20750, mars 2017, doi: 10.18632/oncotarget.15119.
- [257] X. Wang, W. Zhang, X. Sun, Y. Lin, et W. Chen, « Cancer-associated fibroblasts induce epithelial-mesenchymal transition through secreted cytokines in endometrial cancer cells », *Oncol Lett*, vol. 15, n<sup>o</sup> 4, p. 5694-5702, avr. 2018, doi: 10.3892/ol.2018.8000.
- [258] S. Wang, S. Huang, et Y. L. Sun, « Epithelial-Mesenchymal Transition in Pancreatic Cancer: A Review », *Biomed Res Int*, vol. 2017, 2017, doi: 10.1155/2017/2646148.
- [259] S. Dangi-Garimella, S. B. Krantz, M. A. Shields, P. J. Grippo, et H. G. Munshi, « Epithelial-mesenchymal transition and pancreatic cancer progression », in *Pancreatic Cancer and Tumor Microenvironment*, P. J. Grippo et H. G. Munshi, Éd. Trivandrum (India): Transworld Research Network, 2012.
- [260] F. W.-T. Shek *et al.*, « Expression of Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 by Pancreatic Stellate Cells and Its Implications for Matrix Secretion and Turnover in Chronic Pancreatitis », *Am J Pathol*, vol. 160, n<sup>o</sup> 5, p. 1787-1798, mai 2002.
- [261] H.-T. Su *et al.*, « Stem Cell Marker Nestin Is Critical for TGF- $\beta$ 1-Mediated Tumor Progression in Pancreatic Cancer », *Mol Cancer Res*, vol. 11, n<sup>o</sup> 7, p. 768-779, juill. 2013, doi: 10.1158/1541-7786.MCR-12-0511.
- [262] M. Löhr *et al.*, « Transforming growth factor-beta1 induces desmoplasia in an experimental model of human pancreatic carcinoma », *Cancer Res*, vol. 61, n<sup>o</sup> 2, p. 550-555, janv. 2001.
- [263] V. Ellenrieder *et al.*, « Transforming growth factor beta1 treatment leads to an epithelial-mesenchymal transdifferentiation of pancreatic cancer cells requiring extracellular signal-regulated kinase 2 activation », *Cancer Res*, vol. 61, n<sup>o</sup> 10, p. 4222-4228, mai 2001.
- [264] J. Massagué, « TGF $\beta$  in Cancer », *Cell*, vol. 134, n<sup>o</sup> 2, p. 215-230, juill. 2008, doi: 10.1016/j.cell.2008.07.001.
- [265] D. D. Cave *et al.*, « TGF- $\beta$ 1 secreted by pancreatic stellate cells promotes stemness and tumorigenicity in pancreatic cancer cells through L1CAM downregulation », *Oncogene*, vol. 39, n<sup>o</sup> 21, Art. n<sup>o</sup> 21, mai 2020, doi: 10.1038/s41388-020-1289-1.
- [266] G. Ercan, A. Karlitepe, et B. Ozpolat, « Pancreatic Cancer Stem Cells and Therapeutic Approaches », *Anticancer Res*, vol. 37, n<sup>o</sup> 6, p. 2761-2775, 2017, doi: 10.21873/anticancer.11628.

- [267] N. Skrypek, B. Duchêne, M. Hebbar, E. Leteurtre, I. van Seuning, et N. Jonckheere, « The MUC4 mucin mediates gemcitabine resistance of human pancreatic cancer cells via the Concentrative Nucleoside Transporter family », *Oncogene*, vol. 32, n° 13, p. 1714-1723, mars 2013, doi: 10.1038/onc.2012.179.
- [268] V. Drubay *et al.*, « TGF- $\beta$ RII Knock-down in Pancreatic Cancer Cells Promotes Tumor Growth and Gemcitabine Resistance. Importance of STAT3 Phosphorylation on S727 », *Cancers (Basel)*, vol. 10, n° 8, 31 2018, doi: 10.3390/cancers10080254.
- [269] N. Skrypek, R. Vasseur, A. Vincent, B. Duchêne, I. Van Seuning, et N. Jonckheere, « The oncogenic receptor ErbB2 modulates gemcitabine and irinotecan/SN-38 chemoresistance of human pancreatic cancer cells *via* hCNT1 transporter and multidrug-resistance associated protein MRP-2 », *Oncotarget*, vol. 6, n° 13, p. 10853-10867, mai 2015, doi: 10.18632/oncotarget.3414.
- [270] N. Jonckheere, N. Skrypek, et I. Van Seuning, « Mucins and tumor resistance to chemotherapeutic drugs », *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, vol. 1846, n° 1, p. 142-151, août 2014, doi: 10.1016/j.bbcan.2014.04.008.
- [271] B. Hinz, G. Celetta, J. J. Tomasek, G. Gabbiani, et C. Chaponnier, « Alpha-Smooth Muscle Actin Expression Upregulates Fibroblast Contractile Activity », *Mol Biol Cell*, vol. 12, n° 9, p. 2730-2741, sept. 2001.
- [272] C. A. Tonnessen-Murray *et al.*, « Chemotherapy-induced senescent cancer cells engulf other cells to enhance their survival », *J Cell Biol*, vol. 218, n° 11, p. 3827-3844, 04 2019, doi: 10.1083/jcb.201904051.
- [273] J. A. Ewald, J. A. Desotelle, G. Wilding, et D. F. Jarrard, « Therapy-Induced Senescence in Cancer », *J Natl Cancer Inst*, vol. 102, n° 20, p. 1536-1546, oct. 2010, doi: 10.1093/jnci/djq364.
- [274] V. Krizhanovsky *et al.*, « Senescence of activated stellate cells limits liver fibrosis », *Cell*, vol. 134, n° 4, p. 657-667, août 2008, doi: 10.1016/j.cell.2008.06.049.
- [275] R. R. Gordon et P. S. Nelson, « Cellular Senescence and Cancer Chemotherapy Resistance », *Drug Resist Updat*, vol. 15, n° 1-2, p. 123-131, févr. 2012, doi: 10.1016/j.drug.2012.01.002.
- [276] A. Krtolica, S. Parrinello, S. Lockett, P.-Y. Desprez, et J. Campisi, « Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: A link between cancer and aging », *PNAS*, vol. 98, n° 21, p. 12072-12077, oct. 2001, doi: 10.1073/pnas.211053698.
- [277] M. Mijit, V. Caracciolo, A. Melillo, F. Amicarelli, et A. Giordano, « Role of p53 in the Regulation of Cellular Senescence », *Biomolecules*, vol. 10, n° 3, mars 2020, doi: 10.3390/biom10030420.
- [278] M. E. Caldwell *et al.*, « Cellular features of senescence during the evolution of human and murine ductal pancreatic cancer », *Oncogene*, vol. 31, n° 12, p. 1599-1608, mars 2012, doi: 10.1038/onc.2011.350.
- [279] P. C. Rath et B. B. Aggarwal, « TNF-induced signaling in apoptosis », *J Clin Immunol*, vol. 19, n° 6, p. 350-364, nov. 1999, doi: 10.1023/a:1020546615229.



## **Annexe : Matériel et méthodes**



## I. Microfabrication

### 1. Réactifs

Nom	Marque	Référence
Acide sulfurique (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ) 96%	Technic	-
Peroxyde d'hydrogène (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) 30% VLSI	Technic	-
IPA (C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O)	Technic	-
Wafer en Silicium, 3 pouces, SSP	-	-
SU-8 2075	MicroChem	#Y111074 0500L 1GL
Développer SU-8	MicroChem	#Y020100
SYLGARD™ 184 Silicone Elastomer Kit	Dow	#1673921
Lame de verre (76x26x1 mm)	Marienfeld	#1000000

### 2. Fabrication du dispositif

*L'intégralité du protocole de fabrication s'effectue en salle blanche (IEMN)*

Etape 1 : Préparation

- Environ 2 h avant, mettre la SU-8 2075 à T° amb

Etape 2 : Préparation des wafers

- Sous hotte avec protections : préparer un bécher de solution « piranha » : H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (ratio (v/v) 3:1). **Attention**, verser le peroxyde d'hydrogène dans l'acide sulfurique
- Préparer deux béchers de rinçage avec de l'eau
- Plonger le wafer dans la solution « piranha » pendant 1 min
- Effectuer un premier rinçage de 1 min dans le 1er bécher
- Effectuer un deuxième rinçage de 1 min dans le 2ème bécher
- Sécher le wafer avec la soufflette à air. **Attention de ne pas casser le wafer**
- Déshydrater le wafer pendant 10 min à 100°C
- Laisser le wafer revenir à T° amb

Etape 3 : Spin Coating

- Placer le wafer dans le spin coater face polie vers le haut
- Mettre environ 3 ml de SU-8 2075 sur le wafer et attendre que la résine s'étale

- Afin d'obtenir 100 µm d'épaisseur, programmer le spin coater :
  - Step 1 : 500 rpm, 100 rpm/sec, 10 sec
  - Step 2 : 2100 rpm, 300 rpm/sec, 30 sec

*Conseil : Il peut arriver que des bulles soient présentes après le spin coating, si c'est le cas, il faut les percer avec une aiguille puis laisser la résine s'étaler.*

#### Etape 4 : Cuisson post spin coating

- Placer le wafer sur une plaque chauffante à 65°C pendant 5 min
- En laissant le wafer sur la plaque, augmenter la température à 95°C et laisser 20 min

*Conseil : Il peut arriver que l'état de surface se dégrade lors de la montée à 95°C, si c'est le cas, après les 20 min de cuisson, effectuer une descente en température en enlevant le wafer de la plaque. Une fois à température ambiante, le remettre sur la plaque. Répéter le cycle si nécessaire.*

#### Etape 5 : Exposition aux UV

- Nettoyer le masque à l'IPA
- Aligner le masque (partie en Chrome vers le wafer) et le wafer dans l'aligneur
- Régler l'aligneur avec les paramètres suivants puis lancer l'insolation :
  - Temps d'exposition : 24 secondes (240 mJ/cm<sup>2</sup>)

$$t(s) = \text{Energie (mJ/cm}^2\text{)} / \text{Puissance (mW/cm}^2\text{)}$$

- Alignment Gap : 150
- WEC offset : 0
- WEC type : contact
- Exposure type : soft

#### Etape 6 : Cuisson post exposition

- Directement après l'exposition, mettre le wafer à 95°C pendant 10 min sur plaque chauffante

#### Etape 7 : Développement

*Note : la SU-8 étant une résine négative, l'étape de développement conduit à la dissolution de la résine non exposée, laissant ainsi la résine polymérisée sur le wafer*

- Plonger le wafer dans un bécher de développeur SU-8 pendant 10 min sur un agitateur à bascule. Afin d'avoir une meilleure efficacité, changer le développeur au bout de 5 min pour en mettre du neuf.
- Rincer le wafer dans un bécher d'IPA pendant 1 min
- Sécher le wafer avec la soufflette à air. **Attention de ne pas casser le wafer**

#### Etape 8 : Cuisson post développement

- Placer le wafer sur une plaque chauffante à 100°C pendant 10 min
- Une fois la cuisson effectuée, laisser le wafer revenir à température ambiante

#### Etape 9 : Traitement de surface hydrophobe

Avec un Plasmalab 80plus Oxford effectuer un dépôt de CHF<sub>3</sub> sur le moule

- Lancer avec les paramètres suivants : 200 sccm, 500mTorr, RF Power : 200 W, 10 min

*Note : Après cette étape, le protocole peut être repris plus tard. Pour cela, conserver le ou les moules microstructurés en Si/SU-8 dans un endroit sec à l'abri de poussières*

#### Etape 10 : Moulage du PDMS (soft lithography)

- Coller le moule microstructuré dans une boîte de Pétri avec du ruban adhésif double face
- Préparer le PDMS (SYLDGARD™ 184) : Base Elastomère + Agent réticulant (ratio (p/p) 10:1). Attention : peser d'abord la base puis ajouter l'agent réticulant après.
- Très bien homogénéiser puis dégazer dans une cloche à vide

*Conseil : Afin d'accélérer le processus de dégazage, il est possible d'effectuer des montées et descentes en pression sur plusieurs cycles*

- Verser le PDMS sur le moule puis dégazer à nouveau. Ce dégazage permet au PDMS d'aller dans toute la microstructure
- Placer dans un four à 100°C pendant 2 h
- Laisser revenir à température ambiante puis démouler le PDMS à l'aide d'un scalpel. Attention de ne pas casser le moule
- Découper le PDMS à la taille des futurs dispositifs puis percer à l'emporte-pièce ( $\varnothing = 2$  mm) les entrées et sorties du dispositifs afin de connecter les tubes

#### Etape 11 : Nettoyage du PDMS et des lames de verre

- Préparer un bécher d'IPA et un bécher d'eau
- Plonger le PDMS dans le bécher d'IPA
- Placer le bécher dans un nettoyeur à ultrason contenant de l'eau
- Régler à 100% et lancer le nettoyage pour une durée de 10 min
- Rincer le PDMS dans le bécher d'eau puis sécher avec la soufflette à air
- Coller du ruban adhésif (Scotch® Magic, 3M) sur la face structurée du PDMS
- Répéter le même processus de nettoyage avec les lames de verre
- Laisser le PDMS et les lames 24 h dans un endroit sec à l'abri de poussières.  
*Ceci permet au PDMS de dégazer l'IPA*

#### Etape 12 : Collage du PDMS sur les lames de verre

Avec un Plasmalab 80plus Oxford effectuer un traitement au plasmas O<sub>2</sub>

- Retirer le ruban adhésif du PDMS
- Placer le PDMS, face structurée vers le haut, et les lames dans le bâti
- Lancer avec les paramètres suivants : 20 sccm, 200mTorr, RF Power : 75 W, 15 sec
- Dès le processus terminé, coller la face structurée du PDMS sur la face exposée de la lame de verre. Effectuer une pression afin de bien coller.
- Placer les dispositifs dans un four à 100°C pendant 15 min

#### Etape 13 : Finalisation du dispositif

- Dans les trous prévus à cet effet, insérer les tubes en silicone (Ibidi, #10840)
- Seller les tubes avec une goutte de PDMS
- Placer dans un four à 100°C pendant 1h puis laisser revenir à température ambiante
- Mettre les dispositifs dans une boîte de cône propre puis dans une gaine de stérilisation (Sterilsop®), sceller puis autoclaver (121°C pendant 20 min)

### **3. Intégration de BIOMIMESYS® Oncology**

*L'intégralité du protocole s'effectue chez HCS Pharma*

- Ouvrir les gaines et boîtes de cônes dans l'environnement propre proposé par HCS Pharma

- Utiliser des pinces pour tubes (Bürkle) afin de fermer les canaux latéraux des dispositifs
- Injecter BIOMIMESYS® Oncology dans le canal central à l'aide d'une seringue à aiguille
- Remettre les dispositifs remplis dans les boîtes de cônes puis les donner à l'équipe d'HCS Pharma afin qu'ils puissent effectuer la suite du protocole de lyophilisation
- Une fois le processus terminé. Récupérer les boîtes contenant les dispositifs. Sceller dans une gaine de stérilisation (Sterilsop®).
- Stocker en chambre froide à 4°C au laboratoire

## II. Culture cellulaire

### 1. Conditions de culture

Les cellules sont maintenues à 37 °C dans un incubateur régulé à 5 % de CO<sub>2</sub> et une atmosphère humide saturée. Elles sont repiquées une fois par semaine, en travaillant dans des conditions stériles sous PSM de type II à flux laminaire. Enfin, le milieu de culture est changé tous les 2 jours.

### 2. Lignée cellulaire

**PS-1** : Les PS-1 sont des cellules stellaires pancréatiques qui ont été isolées à partir d'un pancréas humain (UK Human TissueBank (Ethics approval; Trent MREC, 05/MRE04/82)) puis immortalisées avec des rétrovirus contenant de l'ADNc codant pour la transcriptase inverse de la télomérase humaine (hTERT) puis sélectionnées avec de la puromycine (1 µg/ml) [198].

**MiaPaCa-2 (ATCC® CRL-1420™)** : La lignée cellulaire MiaPaCa-2 est issue d'une tumeur primaire d'un carcinome pancréatique chez un patient mâle de type caucasien (65 ans). Ce sont des cellules peu différenciées possédant une morphologie épithéliale fusiforme poussant en monocouche de façon adhérente [199].

**PANC-1 (ATCC® CRL-1469™)** : La lignée cellulaire PANC-1 est issue d'une tumeur primaire métastatique d'un carcinome du canal pancréatique chez un patient mâle de type caucasien (56 ans). Ce sont des cellules peu différenciées possédant une morphologie épithéliale ronde poussant en monocouche de façon adhérente [200].

**Capan-2 (ATCC® HTB-80™)** : La lignée cellulaire Capan-2 est issue d'une tumeur primaire non métastatique d'un adénocarcinome pancréatique chez un patient mâle de type caucasien (56 ans). Ce sont des cellules bien différenciées possédant une morphologie épithéliale polygonale poussant en monocouche de façon adhérente [201].

### 3. Réactifs

Nom	Marque	Référence
DPBS (10X)	Gibco	#14200-067
Trypsine-EDTA 0,05% (1X)	Gibco	#25300-054
Trypsine-EDTA 0,25% (1X)	Gibco	#25200-056
DMEM (1X)	Gibco	#41965-039
DMEM/F-12 (1:1) (1X)	Gibco	#11320-074
McCoy's 5A Medium (1X)	Gibco	#26600-023
FBS	Gibco	#10270-106
L-Glutamine 200 Mm (100X)	Gibco	#25030-024
Pénicilline Streptomycine (Pen Strep)	Gibco	#15140-122
Puromycine	InvivoGen	#ant-pr-1
Glycérol stérile	-	-
Collagène I Rat Tail	Corning	#354236
Matrigel™	Corning	#356231
Hydroxyde de sodium (NaOH)	Sigma Aldrich	#S5881

### 4. Préparation des milieux de culture et DPBS 1X

**DPBS 1X** : Dilution au 10ème (v/v) du DPBS 10X dans de l'eau milliQ stérile

**Milieu PS-1** : DMEM/F-12 + 10% (v/v) FBS + 1% (v/v) Pen Strep + 1 µg/ml Puromycine

**Milieu MiaPaCa-2 ATCC** : DMEM + 10% (v/v) FBS + 1% (v/v) Pen Strep + 1% (v/v) L-Glutamine

**Milieu PANC-1 ATCC** : DMEM + 10% (v/v) FBS + 1% (v/v) Pen Strep + 1% (v/v) L-Glutamine

**Milieu Capan-2 ATCC** : McCoy's 5A + 10% (v/v) FBS + 1% (v/v) Pen Strep + 1% (v/v) L-Glutamine

### **5. Décongélation**

Etape 1 : Préparation

- Environ 1 h avant, mettre les milieux au bain marie à 37°C
- Nettoyer l'intérieur du PSM de type II avec du Surfa'Safe (ou produit similaire) et **l'intégralité** du matériel nécessaire avec de l'éthanol avant de le mettre sous le PSM.

Etape 2 : Décongélation

- Décongeler le cryotube au bain marie à 37°C
- Reprendre le cryotube avec 10 ml de milieu complet à 37°C dans un tube à centrifuger

Etape 3 : Centrifugation

- Centrifuger à 1500 rpm pendant 5 min
- Aspirer le milieu. *Faire très **attention** de ne pas aspirer le culot*
- Reprendre le culot avec 1 ml de milieu complet. Bien Homogénéiser

Etape 4 : Remise en culture

- Remettre en culture dans deux T25 avec 5 ml de milieu complet, l'une contenant 1/3 des cellules et l'autre 2/3
- Incuber à 37°C

### **6. Passage/Repiquage**

Etape 1 : Préparation

- Environ 1 h avant, mettre les milieux au bain marie à 37°C et la Trypsine ainsi que le DPBS 1X à T° amb
- Nettoyer l'intérieur du PSM de type II avec du Surfa'Safe (ou produit similaire) et **l'intégralité** du matériel nécessaire avec de l'éthanol avant de le mettre sous le PSM.

## Etape 2 : Rinçage

- Aspirer le milieu de culture usagé
- Rincer le tapis cellulaire avec 5 ml de DPBS 1X (remuer légèrement pour bien nettoyer) puis aspirer

## Etape 3 : Décoller les cellules

- Ajouter  $x$  ml Trypsine ( $x=2$  ml pour une T25 et 4 ml pour une T75). *Utiliser la Trypsine 0,25% pour les Capan-2 ATCC et la 0,05% pour les autres lignées*
- Incuber à 37°C
- Tapoter régulièrement et observer le tapis cellulaire au microscope
- Une fois les cellules décollées, inhiber la Trypsine par minimum 2,5 fois son volume en milieu complet puis récupérer la totalité dans un tube à centrifuger adapté

## Etape 4 : Centrifugation

- Centrifuger à 1500 rpm pendant 5 min
- Aspirer le milieu. *Faire très **attention** de ne pas aspirer le culot*
- Reprendre le culot avec du milieu complet. Bien Homogénéiser

## Etape 5 : Comptage

- Prélever 20  $\mu$ l et ajouter 20  $\mu$ l de bleu trypan (colorant vital). Bien homogénéiser
- Nettoyer la lame de Malassez avec de l'éthanol
- Compter manuellement les cellules sur la lame de Malassez puis faire les calculs.

*Conseil : Toujours compter de la même manière et utiliser les mêmes lames/lamelles*

## Etape 6 : Repiquage

- Préparer les boîtes et ajouter Nom, Numéro de passage, Nombre de cellules et Date
- Ajouter les quantités de cellules calculées lors du comptage dans  $x$  ml de milieu complet ( $x=5$  ml pour une T25 et 10 ml pour une T75)
- Ajouter l'ensemble dans la T25 (ou T75)
- Incuber à 37°C

## **7. Cryoconservation**

*Suivre le protocole de passage/repiquage jusqu'à l'étape 5 (comptage) incluse. Puis passer à l'étape suivante :*

Etape 6 : Congélation

- Préparer des cryotubes et ajouter Nom, Numéro de passage, Nombre de cellules et Date
- Ajouter les doses calculées lors du comptage dans du milieu complet afin d'obtenir le volume souhaité et ajouter 10% (v/v) de FBS et 10 % (v/v) de Glycérol. Bien homogénéiser
- Remplir les cryotubes puis les placer dans une boîte contenant de l'IPA à - 80°C
- Au bout de 48h stocker les cryotubes dans l'azote liquide

## **8. Culture 3D et microfluidique**

Etape 1 : Préparation

- Environ 1 h avant, mettre les milieux au bain marie à 37°C et la Trypsine ainsi que le DPBS 1X à T° amb
- Si une expérience microfluidique est prévue, préparer les dispositifs (connecteurs Ibidi®) puis placer à 4°C
- Préparer un bac de glace
- Nettoyer l'intérieur du PSM de type II avec du Surfa'Safe (ou produit similaire) et **l'intégralité** du matériel nécessaire avec de l'éthanol avant de le mettre sous le PSM
- Préparer la solution de collagène :
  - Calculer les volumes à prélever :

*Volume collagène = (Volume final x Concentration finale en collagène en mg/ml) /  
Concentration du flacon de collagène*

*Volume DPBS 10X = Volume final/10*

*Volume NaOH = Volume Collagène x 0,023. Bien homogénéiser. Permet de neutraliser le pH acide du collagène*

*Volume dH<sub>2</sub>O = Volume final – (Volume Collagène + Volume NaOH + Volume DPBS)*

*Par ex. pour 1 ml de solution finale à 2 mg/ml de collagène et un flacon mère à 3,52 mg/ml, on a :*

*318,7 µl dH<sub>2</sub>O + 100 µl DPBS 10X + 13,1 µl NaOH + 568,2 µl collagène = 1 ml*

- Placer sur glace les solutions de dH<sub>2</sub>O, DPBS 10X, NaOH et collagène
- Dans un tube, ajouter dans l'ordre suivant : dH<sub>2</sub>O, DPBS 10X, NaOH puis le collagène
- Bien homogénéiser puis garder la solution finale sur glace. Utilisable 2h

*Ensuite suivre le protocole de passage/repiquage jusqu'à l'étape 5 (comptage) incluse.*

*Puis passer à l'étape suivante :*

**Etape 6 : 2<sup>ème</sup> Centrifugation**

- Ajouter les quantités de cellules calculées lors du comptage dans 5 ml de milieu complet
- Centrifuger à 1500 rpm pendant 5 min
- Aspirer le milieu. *Faire très **attention** de ne pas aspirer le culot*
- Reprendre le culot avec la solution de collagène. Remettre sur glace jusqu'à utilisation

**Etape 7 : Mise en culture**

*Culture 3D sur plaque*

- Préparer le support (plaque ou chambre sur lame)
- Bien homogénéiser la solution de collagène
- Former un dôme de collagène par puits. *Attention de pas faire vibrer le support au risque de casser les dômes.*
- Incuber 1 h à 37°C
- Ajouter le milieu complet
- Incuber à 37°C

*Culture microfluidique*

- Sortir du réfrigérateur et préparer les dispositifs
- Faire passer de l'éthanol, puis du DPBS 1X puis du milieu de culture complet dans le pousse seringue CETONI
- Utiliser des pinces pour tubes (Bürkle) afin de fermer les canaux latéraux
- Bien homogénéiser la solution de collagène avec les cellules

- Prélever 50 µl et injecter doucement dans le canal central
- Fermer les pinces du canal central
- Incuber 1 h à 37 °C
- Brancher les dispositifs au pousse seringue CETONI, ouvrir les pinces puis lancer la perfusion de milieu complet à 10 nl/s
- Incuber à 37°C
- Au bout de 24 h fermer le canal inférieur et continuer la perfusion du canal supérieur avec du milieu complet à 10 nl/s

*Note : le protocole pour le Matrigel™ est identique*

### III. Traitement des cellules par chimiothérapies

#### 1. Réactifs

Nom	Marque	Référence
DMSO Stérile	Sigma Aldrich	#D8418
5-Fluorouracil	Sigma Aldrich	#F6627-5G
Oxaliplatine	Sigma Aldrich	#O9512-5MG
SN-38	Sigma Aldrich	#H0165-10MG
Milieu de culture complet	Gibco	-

#### 2. Traitements

Etape 1 : Préparation

- Environ 1 h avant, mettre les milieux au bain marie à 37°C
- Nettoyer l'intérieur du PSM de type II avec du Surfa'Safe (ou produit similaire) et **l'intégralité** du matériel nécessaire avec de l'éthanol avant de le mettre sous le PSM
- Préparer les solutions stock de chimiothérapie et conserver à 4°C après utilisation :
  - DMSO + 5-FU à 100 mM
  - DMSO + Oxaliplatine à 12,6 mM
  - DMSO + SN-38 à 10 mM

## Etape 2 : Traitements

### *Culture 2D et 3D*

- Préparer avec du milieu complet un mélange des trois drogues aux concentrations voulues
- Aspirer le milieu de culture
- Ajouter le mélange sur les cellules
- Incuber à 37°C durant 72h

### *Culture microfluidique*

- Préparer avec du milieu complet un mélange des trois drogues aux concentrations voulues
- Préparer avec du milieu complet un mélange avec du 5-FU à la concentrations voulue
- A l'aide du port d'injection (Ibidi) et du pousse seringue KDS Legato injecter le mélange des trois drogues à 0,5 µl/s durant 10 min. *Simulation d'un Bolus*
- Puis avec le pousse seringue CETONI réaliser une perfusion du mélange 5-FU pendant 72h (10 nl/s) sous incubation à 37°C

## IV. Mesure de la viabilité cellulaire

### **1. Réactifs**

Nom	Marque	Référence
DPBS (1X)	Gibco	-
Milieu de culture complet	Gibco	-
MTT (sel de tétrazolium)	Sigma Aldrich	-
DMSO Stérile	Sigma Aldrich	#D8418
Kit de viabilité/cytotoxicité Live/Dead™	Invitrogen	#L3224

## 2. Test MTT

### Etape 0 : Préparation

- Environ 1 h avant, mettre les milieux au bain marie à 37°C et le DPBS 1X à T° amb
- Nettoyer l'intérieur du PSM de type II avec du Surfa'Safe (ou produit similaire) et l'intégralité du matériel nécessaire avec de l'éthanol avant de le mettre sous le PSM
- Préparer une solution stock réutilisable : MTT en poudre + DPBS (1X) à 5 mg/ml de MTT
- Stocker à - 20°C après utilisation

*La suite du protocole est pour une plaque 96 puits*

### Etape 1 : Rinçage

- Aspirer le milieu de culture usagé
- Rincer le tapis cellulaire avec 200 µl/puits de DPBS (1X) puis aspirer

### Etape 2 : Incubation MTT

- A partir de la solution stock, préparer une solution à 0,5 mg/ml dans du milieu complet
- Ajouter 200 µl/puits de la solution de MTT à 0,5 mg/ml
- Incuber pendant 1 h à 37°C. *Pour les PS-1 et les Capan-2 ATCC incuber 2 h*

### Etape 3 : Solubilisation des sels de tétrazolium

- Aspirer la solution de MTT
- Ajouter 100 µl/puits de DMSO
- Incuber 10 min à T° amb

### Etape 4 : Mesure & Analyse

- Mesurer la densité optique des puits à 570 nm dans un lecteur de plaque (Multiskan FC, Thermo Scientific)
- Les analyses sont ensuite faites avec le logiciel GraphPad

### 3. Test Live/Dead

Les étapes suivantes se font à l'abri de la lumière

Etape 0 : Préparation

- Nettoyer l'intérieur du PSM de type II avec du Surfa'Safe (ou produit similaire) et l'**intégralité** du matériel nécessaire avec de l'éthanol avant de le mettre sous le PSM
- Préparer la solution Live/Dead : 5 µl calcein AM (2 µM - Composant A) + 20 µl ethidium homodimer-1 (4 µM - Composant B) + 10 ml DPBS (1X)

Etape 2 : Incubation Live/Dead

*Culture 2D & 3D (pour une plaque 24 puits)*

- Aspirer le milieu de culture usagé
- Bien homogénéiser la solution Live/Dead
- Ajouter 200 µl/puits de solution
- Incuber 30 min à T° amb

*Culture microfluidique (6 dispositifs)*

- Connecter les dispositifs au pousse seringue KDS Legato. Utiliser des seringues 10 ml (Terumo)
- Perfuser 300 µL de solution Live/Dead par dispositif à 0,5 µl/sec
- Incuber 30 min à T° amb

Etape 3 : Mesure & Analyse

- Prendre des photos des régions d'intérêts à l'aide d'un microscope confocale à fluorescence (Zeiss AxioObserver Z1 associé à une tête Spinning Disk Yokogawa CSU-X1, une caméra sCMOS Photometrics Prime 95B, LASERS 405, 488, 568 et 635 nm et au logiciel ZEN 2.3 – Modules Tiles et Z-stack)
  - Calcein AM – Filtre FITC
  - EthD-1 – Filtre Cy5 ou DsRed
- Les analyses sont ensuite faites avec les logiciels IMARIS, Fiji et GraphPad

## V. Immunofluorescence

### 1. Réactifs

Nom	Marque	Référence
DPBS [++] (10X)	Gibco	#14080-048
Paraformaldehyde, 4% (v/v) in PBS (PFA)	Alfa Aesar	#J61899
Sérum d'Albumine Bovine (BSA)	Sigma Aldrich	#A7906
Saponine	Sigma Aldrich	#S2149
Chlorure d'Ammonium 99,5%	Sigma Aldrich	#A9434
Triton™ X-100	Sigma Aldrich	#T8787
Hoechst 33342	Invitrogen	#H21492

### 2. Réalisation des immunomarquages fluorescents

#### Etape 1 : Préparation

- Préparer une solution d'Hoechst 33342 à 10 mg/ml dans de l'eau milliQ stérile. Stocker à l'abri de la lumière
- DPBS [++] 1X : Dilution au 10ème (v/v) du DPBS [++] 10X dans de l'eau milliQ stérile
- Solution de Chlorure d'Ammonium 50 mM dans du DPBS [++] 1X
- Solution de perméabilisation : Saponine 0,2% (p/v) + Triton 1% (v/v) + DPBS [++] 1X
- Solution de saturation : Saponine 0,2% (p/v) + Triton 1% (v/v) + BSA 3 % (p/v) + DPBS [++] 1X

*Filtrer toutes les solutions avec un filtre 0,22 µm sauf le Hoechst 33342*

#### **Culture 2D & 3D (pour une plaque 24 puits)**

#### Etape 2 : Fixation des cellules

- Aspirer le milieu de culture usagé
- Effectuer 3 rinçages au DPBS [++] 1X
- Ajouter 200 µl/puits de PFA 4% (v/v)
- Incuber 20 min à T° amb
- Aspirer le PFA 4% (v/v)

#### Etape 3 : Neutralisation du PFA

- Ajouter 200 µl/puits de solution de chlorure d'ammonium
- Incuber 20 min à T° amb
- Aspirer le Chlorure d'Ammonium

#### Etape 4 : Perméabilisation des membranes plasmiques et nucléaires

- Ajouter 200 µl/puits de solution de perméabilisation
- Incuber 20 min à T° amb
- Aspirer la solution de perméabilisation

#### Etape 5 : Saturation des sites aspécifiques

- Ajouter 200 µl/puits de de solution de saturation
- Incuber 20 min à T° amb
- Aspirer le PFA

#### Etape 6 : Incubation anticorps primaire

- Préparer une solution : anticorps primaire (voir liste des anticorps) + solution de saturation
- Ajouter 200 µl/puits
- Incuber 12 h à T° amb
- Effectuer 3 rinçages au DPBS [++] 1X

#### Etape 7 : Incubation anticorps secondaire. *A l'abri de la lumière.*

- Préparer une solution : anticorps secondaire (voir liste des anticorps) + Hoechst à 5 µg/ml + solution de saturation
- Ajouter 200 µl/puits
- Incuber 2 h à T° amb
- Effectuer 3 rinçages au DPBS [++] 1X

#### **Culture microfluidique (6 dispositifs)**

- Connecter les dispositifs au pousse seringue KDS Legato. Utiliser des seringues 10 ml (Terumo)

*Conseil : Utiliser les 2 canaux*

#### Etape 2 : Fixation des cellules

- Perfuser 500 µl de DPBS [++] 1X par dispositif à 1 µl/sec
- A la suite, perfuser 300 µl de PFA 4% (v/v) par dispositif à 1 µl/sec
- Incuber 20 min à T° amb

#### Etape 3 : Neutralisation du PFA

- Perfuser 300 µl de solution de chlorure d'ammonium par dispositif à 1 µl/sec
- Incuber 20 min à T° amb

#### Etape 4 : Perméabilisation des membranes plasmiques et nucléaires

- Perfuser 300 µl de solution de perméabilisation par dispositif à 1 µl/sec
- Incuber 20 min à T° amb

#### Etape 5 : Saturation des sites aspécifiques

- Perfuser 300 µl de solution de saturation par dispositif à 1 µl/sec
- Incuber 20 min à T° amb

#### Etape 6 : Incubation anticorps primaire

- Préparer une solution : anticorps primaire (voir liste des anticorps) + solution de saturation
- Perfuser 300 µl par dispositif à 0,5 µl/sec
- Incuber 12 h à T° amb
- Perfuser 300 µl de DPBS [++] 1X par dispositif à 1 µl/sec

#### Etape 7 : Incubation anticorps secondaire. *A l'abri de la lumière.*

- Préparer une solution : anticorps secondaire (voir liste des anticorps) + Hoechst à 5 µg/ml + solution de saturation
- Perfuser 300 µl par dispositif à 0,5 µl/sec
- Incuber 2 h à T° amb
- Perfuser 300 µl de DPBS [++] 1X par dispositif à 1 µl/sec

## **Suite pour la culture 2D, 3D et microfluidique**

### Etape 8 : Mesure & Analyse

- Prendre des photos des régions d'intérêt à l'aide d'un microscope confocale à fluorescence (Zeiss AxioObserver Z1 associé à une tête Spinning Disk Yokogawa CSU-X1, une caméra sCMOS Photometrics Prime 95B, LASERS 405, 488, 568 et 635 nm et au logiciel ZEN 2.3 – Modules Tiles et Z-stack)
  - Alexa 488 – Filtre FITC
  - Alexa 594 – Filtre Cy5 ou DsRed
  - Hoescht – Filtre DAPI
- Les analyses sont ensuite faites avec les logiciels IMARIS, Fiji et GraphPad

## **VI. Préparation d'extraits protéiques totaux**

### **1. Réactifs**

<b>Nom</b>	<b>Marque</b>	<b>Référence</b>
DPBS (1X)	Gibco	-
Tampon RIPA	Sigma Aldrich	#R0278
cOmplete™ ULTRA Tablets, Mini, EASYpack Protease Inhibitor Cocktail	Roche	#05892970001
Étalons d'albumine sérique bovine Pierce™ (BSA)	Thermo Scientific	#23209
Pierce™ BCA Protein Assay Reagent A	Thermo Scientific	#23228
Pierce™ BCA Protein Assay Reagent B	Thermo Scientific	#23224

### **2. Extraction des protéines totales**

#### Etape 1 : Préparation

- Nettoyer l'intérieur du PSM de type II avec du Surfa'Safe (ou produit similaire) et l'intégralité du matériel nécessaire avec de l'éthanol avant de le mettre sous le PSM.
- Préparer la solution de lyse : 10 ml de Tampon RIPA + 1 pastille de Protease Inhibitor Cocktail. Bien homogénéiser.
- Préparer un bac de glace et des grattoirs de cellules

#### Etape 2 : Rinçage

- Aspirer le milieu de culture
- Rincer le tapis cellulaire avec 5 ml de DPBS 1X (remuer légèrement pour bien nettoyer) puis aspirer

### Etape 3 : Lyse (sur glace)

- Ajouter x µl de solution de lyse (x=100 µl pour une T25 et 300 µl pour une T75)
- Bien répartir et laisser agir sur glace 10 min
- Gratter les cellules et récupérer l'ensemble dans un tube 1,5 ml
- Durant 30 min effectuer des passages sur une grille toutes les 5 min. Attention de ne pas casser le tube

### Etape 4 : Centrifugation

- Centrifuger à 16000 x g pendant 10 min à 4°C
- Récupérer le surnageant. Faire très attention de ne pas aspirer le culot contenant les débris
- Mettre sur glace si dosage immédiat ou stocker à - 80°C

## 3. Dosage des protéines

*Le dosage des protéines est réalisé en plaque 96 puits à fond transparent par dosage colorimétrique utilisant de l'acide bicinchoninique (BCA).*

### Etape 1 : Préparation

- Préparer une solution de dosage BCA : réactif A + réactif B (ratio (v/v) 50:1)
- Réaliser sur la première ligne de la plaque une gamme d'étalonnage avec de la BSA (2 mg/ml) :

Puits	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
BSA (2 mg/ml)	0 µl (0 µg)		0,5 µl (1 µg)		1 µl (2 µg)		2 µl (4 µg)		4 µl (8 µg)		8 µl (16 µg)	

- Mettre 2 µl/puits d'extrait protéique en duplicata
- Ajouter 200 µl/puits de solution de dosage BCA sur la gamme et les échantillons

### Etape 2 : Incubation

- Incuber la plaque pendant 1 h à 37°C sous agitation (Vortemp 56, Labnet)

### Etape 3 : Mesure et Analyse

- Mesurer l'absorbance des puits à 562 nm dans un lecteur de plaque (Multiskan FC, Thermo Scientific)
- Les analyses sont ensuite faites avec le logiciel GraphPad. La quantité de protéines est calculée à partir de la gamme d'étalonnage

## VII. Western Blotting

### 1. Réactifs

Nom	Marque	Référence
Tampon de charge Novex™ NuPAGE™ LDS (4X)	Invitrogen	#NP0007
Gels de protéines Tris-Acetate Novex™ NuPAGE™ 3 à 8 %, mini, 1,5 mm	Invitrogen	#EA0378BOX
Gels de protéines Bis-Tris Novex™ NuPAGE™ 4 à 12 %, mini, 1,5 mm	Invitrogen	#NP0335BOX
Tampon de migration MOPS SDS Novex™ NuPAGE™ (20X)	Invitrogen	#NP0001
Tampon de migration Tris-Acetate SDS Novex™ NuPAGE™ (20X)	Invitrogen	#LA0041
Antioxydant Novex™ NuPAGE™	Invitrogen	#NP0005
Échelle de protéines précolorée PageRuler™ Plus 10-250 kDa	Thermo Scientific	#26619
Échelle de protéines précolorée PageRuler™ 10-180 kDa	Thermo Scientific	#26616
Membrane de Nitrocellulose 0,2 µm	GE Healthcare	#GE10600014
Tween-20	Thermo Scientific	#28346
HCl	VWR	#20255290
NaCl	Fisher Chemical	#S/3160/60
Glycine	Alfa Aesar	#J64365
Tris	Alfa Aesar	#31801
Méthanol	VWR	#20846361
Solution de SDS 20% (p/v)	VWR	#M112
Papier Whatman® 1 Chr	-	-
Lait écrémé en poudre	-	-
Substrat chimiluminescent SuperSignal™ West Pico PLUS	Thermo Scientific	#34578

## **2. Préparation des tampons**

### **Tampon TBST-T 1X :**

Préparer 2 litres : Tris-HCl 50 mM, pH 8,3 + NaCl 150 mM + 0,05 % (v/v) Tween-20

### **Tampon de migration :**

- Si **gel Bis-Tris** : ajouter 50 ml du Tampon 20X MOPS SDS dans 950 ml d'eau osmosée
- Si **gel Tris-Acetate** : ajouter 50 ml du Tampon 20X Tris-Acetate SDS dans 950 ml d'eau osmosée

### **Tampon de transfert :**

Préparer 1 litre : Glycine à 192 mM + Tris à 25 mM, pH 8,3 + 20 % (v/v) Méthanol + 0,005 % (v/v) SDS

## **3. Préparation des échantillons**

- Prélever le volume calculé lors du dosage contenant 20 µg de protéines
- Ajouter 1/3 du volume correspondant en tampon de charge (4X)
- Dénaturer les échantillons à 100°C pendant 5 min
- Centrifuger sur la centrifugeuse de paillasse durant 1 min

## **4. Migration en système Invitrogen (Novex® Mini-Cell)**

### **Etape 1 : Montage du système Invitrogen**

- Monter la cassette dans la cuve
- Retirer le peigne et la bande adhésive des gels
- Insérer les gels dans le système, face avec les puits vers le centre, puis verrouiller
- Remplir la zone centrale, entre les deux gels, avec du tampon de migration. Bien immerger les puits
- Ajouter 500 µl d'antioxydant dans la zone centrale et rincer les puits
- Remplir le reste de la cuve avec du tampon de migration

### **Etape 2 : Dépôt des échantillons**

- Déposer 5 µl de marqueur de taille (adapté à la taille de la protéine d'intérêt) dans le 1er puits
- Déposer les échantillons dans les puits suivants

*Conseil : Si des puits sont inutilisés, ajouter 10 µl de tampon de charge 4X afin d'avoir une migration droite*

### Etape 3 : Migration

- Connecter le système au générateur
- Faire migrer pendant 1 h à 150 V (gel Tris-Acetate) ou 50 min à 200 V (gel Bis-Tris)
- Vérifier régulièrement que le front de migration ne sorte pas du gel

## **5. Transfert en système liquide BioRad (Mini Trans-Blot® Cell)**

### Etape 1 : Montage de la cassette de transfert

- Tremper 2 éponges et 4 papiers Whatman dans du tampon de transfert pour chaque gel
- Démonter la cassette de migration afin de récupérer le gel
- Monter la cassette de transfert de la manière suivante :

Pôle négatif (face noir)	Eponge	2 papiers Whatman	Gel	Membrane de Nitrocellulose	2 papiers Whatman	Eponge	Pôle positif (face rouge)
--------------------------	--------	-------------------	-----	----------------------------	-------------------	--------	---------------------------

*Entre chaque « couche », retirer les bulles d'air à l'aide d'une roulette.*

- Placer la cassette dans le système de transfert. Bien respecter les pôles.
- Remplir la cuve de tampon de transfert
- Ajouter un pain de glace afin de refroidir le système

### Etape 2 : Transfert

- Lancer le transfert sous agitation pendant 1 h à 100 V

## **6. Saturation et incubation des anticrops**

### Etape 1 : Saturation

- Effectuer 3 lavages de la membrane pendant 5 min dans du TBST-T 1X sous agitation
- Préparer une solution de lait écrémé en poudre + TBS-T 1X (10% (p/v))
- Saturer la membrane avec la solution de lait écrémé pendant 1 h sous agitation
- Effectuer 3 lavages de la membrane pendant 5 min dans du TBST-T 1X sous agitation

## Etape 2 : Incubation anticorps primaire

- Préparer une solution d'anticorps primaire (voir liste des anticorps) + TBS-T 1X + BSA 5 % (p/v)
- Verser sur la membrane et laisser 2 h sous agitation à T° amb ou 12 h à 4°C
- Effectuer 3 lavages de la membrane pendant 5 min dans du TBST-T 1X sous agitation

## Etape 3 : Incubation anticorps secondaire

- Préparer une solution d'anticorps secondaire (voir liste des anticorps) + TBS-T 1X + BSA 5 % (p/v)
- Verser sur la membrane et laisser 1 h sous agitation à T° amb
- Effectuer 3 lavages de la membrane pendant 5 min dans du TBST-T 1X sous agitation

### **7. Révélation**

*Les étapes suivantes se font à l'abri de la lumière*

- Mélanger les réactifs chimiluminescent SuperSignal™ A et B (ratio (v/v) 1:1)
- Incuber la membrane durant 5 min dans le SuperSignal™
- Prendre des photos à l'aide du LAS 4000

## **VIII. Visualisation des écoulements et de la diffusion**

### **1. Réactifs**

Nom	Marque	Référence
DPBS (1X)	Gibco	-
Fluorescéine	Sigma Aldrich	#46960

### **2. Mesures**

#### Etape 1 : Préparation

- Préparer un dispositif avec du collagène I (2 mg/ml) sans cellules dans le canal central en suivant le protocole de culture cellulaire microfluidique (II – 8)
- Préparer une solution de fluorescéine dans du DPBS 1X (1mg/ml)

## Etape 2 : Mise en place des flux

- Perfuser les canaux latéraux avec du DPBS 1X à 1 µl/s
- Une fois les canaux remplis, fermer le canal inférieur puis perfuser le canal supérieur avec la solution de fluorescéine à 10 nl/s

## Etape 3 : Mesures et Analyse

- Prendre des photos des régions d'intérêt à l'aide d'un microscope à fluorescence (Leica Dmi8 avec caméra CMOS Orca Flash 4 associé au logiciel LAS X – Modules Time (t) avec une image toutes les 5 secs)
  - Fluorescéine – Filtre FITC
- Les analyses sont ensuite faites avec les logiciels Fiji

## IX. Liste des anticorps

Anticorps	Taille (kDa)	Espèce	Application	Dilution	Marque	Référence
Anti-Rb HRP (H+L)	-	G	WB	1/5000	Invitrogen	#31460
Anti-Ms HRP (H+L)	-	G	WB	1/5000	Invitrogen	#31430
β-Actine	42	Ms mAb	WB	1/5000	Sigma Aldrich	#A5441
E-Cadhérine	135	Rb mAb	WB	1/1000	Cell Signaling	#3195S
E-Cadhérine	135	Ms mAb	IF	1/100	Cell Signaling	#14472S
α-SMA	42	Rb pAb	WB	1/1000	Abcam	#ab5694
α-SMA	42	Rb mAb	IF	1/100	Cell Signaling	#19245S
Fibronectine	285	Rb	WB	1/1000	Abcam	#ab2413
Fibronectine	220 - 240	Ms mAb	IF	1/100	Sigma Aldrich	#F7387
Vimentine	57	Rb mAb	WB IF	1/1000 1/100	Cell Signaling	#5741S
Alexa 488 Anti-Rb IgG (H+L)	-	G pAb	IF	1/200	Invitrogen	#A11008
Alexa 488 Anti-Ms IgG (H+L)	-	D pAb	IF	1/200	Invitrogen	#A21202
Alexa 594 Anti-Rb IgG (H+L)	-	G pAb	IF	1/200	Invitrogen	#A11012
Alexa 594 Anti-Ms IgG (H+L)	-	G pAb	IF	1/200	Invitrogen	#A11032

G=Goat, D=Donkey, Rb=Rabbit, Ms=Mouse, mAb = polyclonal Antibody, pAb = polyclonal Antibody, WB = Western Blot, IF = Immunofluorescence

## X. Analyses

### 1. Fiji by ImageJ

#### a. Vitesse de l'écoulement et de diffusion

La vitesse du flux interstitiel a été calculée en effectuant une mesure image par image de l'avancée du front de fluorescéine. Cette analyse nous permet d'obtenir un  $\Delta d$  et connaissant le  $\Delta t$  entre les images, nous obtenons ainsi la vitesse  $v = \Delta d / \Delta t$ .

Afin d'étudier la diffusion, nous avons analysé la distribution de l'intensité de la fluorescéine le long du canal centrale :

- Tracer une ligne d'intérêt
- Puis utiliser la fonction : *Analyze > Plot Profil*

#### b. Expression des protéines

L'expression des protéines en immunofluorescence a été analysée avec l'intensité mesurée de chaque canal (DAPI/FITC/DsRed ou Cy5). Avec Fiji, pour chaque canal, effectuer :

- *Analyze > Set Measurement* puis cocher *Limit to threshold*
- *Image > Type > 8-bit*
- Détourer la cellule/groupe de cellules manuellement
- *Image > Adjust > Threshold* puis fixer la limite (mettre la même pour chaque image afin de pouvoir comparer)
- *Analyze > Measure*

Les valeurs d'intensité sont ensuite disponibles dans le tableau qui apparaît. Pour comparer les mesures, les valeurs d'intensité des protéines sont rapportées sur celles du DAPI. Ces valeurs sont ensuite analysées avec GraphPad.

#### c. Morphologie des cellules

La morphologie des fibroblastes sous chimiothérapie a été analysée avec le critère de circularité :

- *Analyze > Set Measurement* puis cocher *Shape descriptors, Feret's diameter* et *Limit to threshold*
- *Image > Type > 8-bit*
- Détourer la cellule manuellement

- Image > Adjust > Threshold puis fixer la limite (mettre la même pour chaque image afin de pouvoir comparer)
- Analyze > Measure

La valeur de circularité et le nombre de Feret sont ensuite disponibles dans le tableau qui apparaît. Ces valeurs sont ensuite analysées avec GraphPad.

## 2. IMARIS

Afin d'analyser la viabilité suite à nos marquages Live/Dead, nous avons utilisé le logiciel IMARIS. Pour simplifier nos analyses, une macro nous permettant de compter les objets et leurs volumes a été créée :

### *Add new surfaces*

- [Algorithm]
- Enable Region Of Interest = false
- Enable Region Growing = false
- Enable Tracking = false
- Enable Classify = true
- Enable Shortest Distance = true
- [Source Channel]
- Source Channel Index = **1** or **2** (Sélectionner le canal à analyser)
- Enable Smooth = true
- **Surface Grain Size = 0.917  $\mu\text{m}$**  (fixé dans la macro)
- **Enable Eliminate Background = true** (fixé dans la macro)
- **Diameter Of Largest Sphere = 3.44  $\mu\text{m}$**  (fixé dans la macro)
- [Threshold]
- Enable Automatic Threshold = false
- Manual Threshold Value = **48.5115** (à régler en fonction de l'image)
- Active Threshold = true
- Enable Automatic Threshold B = true
- Manual Threshold Value B = **780.064** (à régler en fonction de l'image)
- Active Threshold B = false
- [Filter Surfaces]
- "Number of Voxels Img=1" above **2610** (à régler en fonction de l'image)

Les valeurs sont ensuite disponibles dans l'onglet "Detailed" :

- *Count* pour le nombre d'objets détectés
- *Mean Volume* pour le volume moyen des objets détectés

Le ratio Live/Dead est ensuite calculé de la manière suivante :

$$\%cellule\ vivante = \frac{PosG}{PosG + PosR} \times 100$$

Avec  $PosG = Mean\ Volume\ G \times Count\ G$  les objets positifs vert (Live) et  $PosR = Mean\ Volume\ R \times Count\ R$  les objets positifs rouge (Dead). Ces valeurs sont ensuite analysées avec GraphPad.

### **3. Logiciel GraphPad Prism**

#### **a. Analyse de l'IC<sub>50</sub>**

Les données brutes sont normalisées :

- *Analyze > Data manipulations > Normalize > Smallest/Largest value in each data set*

Les courbes dose-réponse sont effectuées :

- *Analyze > Curves & regression > Nonlinear regression.*
- *Equation > Sigmoidal dose-response*
- *Comparison > Does the best-fit value of a selected parameter differ between data sets ? > LOGC50*
- *Constraints > Bottom/Top > Constant equal to > 0 or 100 respectivement*

Les valeurs des doses IC<sub>50</sub> ainsi que les écart-types sont ensuite disponibles dans l'onglet "Table of results".

#### **b. Statistique**

Les données sont représentées en tant que moyenne ± écart-type. La différence entre deux moyennes de deux échantillons est analysée par le test de *ANOVA One Way* pour une analyse de plus de deux échantillons avec un paramètre. Si l'analyse comprends deux paramètres, le test utilisé est *ANOVA Two Way*. Le post test *Tukey Multiple Comparison* a ensuite été utilisé quand une *p-value* inférieure à 0,05 est considérée significative et est indiquée par \*, avec  $p < 0,01$  \*\* ou  $p < 0,001$  \*\*\*.



**Annexe : Publications et communications**



## **Article original**

**Frédéric de Miollis**, Charles Poiraud, Zied Souguir, Elodie Vandenhautte, Audrey Vincent, Nathalie Maubon, Vincent Senez et Isabelle Van Seuningen. « A Novel 3D Microfluidic Co-Culture Model to Study FOLFIRINOX Chemoresistance of Pancreatic Cancer using a Collagen and Hyaluronic Acid Based Matrix ». *Cancers* 2021 (**soumis**)

## **Communications orales**

**Frédéric de Miollis**, Isabelle Van Seuningen et Vincent Senez. « Development of a 3D *in vitro* microfluidic culture system to study tumor-stroma interactions and drug resistance of pancreatic adenocarcinoma ». NAMIS Workshop, National Tsing Hua University, Hsinchu, Taiwan. Novembre 2017.

**Frédéric de Miollis**, Romain Vasseur, Isabelle Van Seuningen et Vincent Senez. « Development of a 3D *in vitro* microfluidic culture system to study tumor-stroma interactions and drug resistance of pancreatic adenocarcinoma ». Journée des doctorants du Centre de Recherche Jean-Pierre Aubert, Lille, France. Mars 2018.

**Frédéric de Miollis**, Romain Vasseur, Isabelle Van Seuningen et Vincent Senez. « Développement d'un système de culture *in vitro* 3D et microfluidique pour étudier les interactions tumeur-stroma et la résistance aux drogues de l'adénocarcinome du pancréas ». Journée AFRCP, Hôpital Beaujon, Clichy, France. Novembre 2018

**Frédéric de Miollis**, Romain Vasseur, Isabelle Van Seuningen et Vincent Senez. « Development of a 3D *in vitro* microfluidic culture system to study tumor-stroma interactions and drug resistance of pancreatic adenocarcinoma ». Cancer Cell on Chip, Faculté de Médecine, Lyon, France. Mars 2019

**Frédéric de Miollis**, Romain Vasseur, Isabelle Van Seuningen et Vincent Senez. « Development of a 3D *in vitro* microfluidic culture system to study tumor-stroma interactions and drug resistance of pancreatic adenocarcinoma ». Journée des doctorants du laboratoire CANTHER, Lille, France. Mars 2019.

**Frédéric de Miollis**, Zied Souguir, Romain Vasseur, Elodie Vandenhautte, Nathalie Maubon, Isabelle Van Seuningen et Vincent Senez, « Engineering microscale biomimetic hydro scaffold for dynamic three-dimensional modeling of pancreatic cancer ». MACRO2020, International Convention Center, Jeju, Corée du Sud. Juillet 2020 – **annulée**

**Frédéric de Miollis**, Zied Souguir, Charles Poiraud, Joseph de Saxcé, Lucie Dercourt, Elodie Vandenhautte, Audrey Vincent, Nathalie Maubon, Isabelle Van Seuningen et Vincent Senez. "Engineering Microscale Biomimetic Hydrosccaffold for Dynamic Three-Dimensional Modeling of Pancreatic Cancer," *2021 IEEE 34th International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (MEMS)*, Gainesville, FL, USA, 2021, pp. 407-410, doi : 10.1109/MEMS51782.2021.9375317.